

Celledød og organellefordeling i sentrifugeringsfraksjoner fra kornceller og PC12-celler

Stine Malme



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap ved Farmasøytisk Institutt, Universitet i Oslo, i perioden august 2010 til mai 2011 som den avsluttende delen av graden Master i Farmasi. Det har vært et givende, lærerikt og veldig spennende år som har gitt meg et innblikk i forskningsverdenen.

Jeg vil takke til min hovedveileder, professor Ragnhild Elisabeth Paulsen, som med sitt engasjement, faglige kunnskap og innspill har vært en stor kilde til inspirasjon og oppmuntring under hele arbeidet med denne oppgaven.

Jeg vil også takke min medveileder, post doc Gro Haarklou Mathisen, som har vært en veldig viktig del av dette prosjektet. Hennes gode opplæring, faglige samtaler, innspill og tilbakemeldinger har vært av stor betydning for meg dette året.

I tillegg ønsker jeg å takke alle på ZEB-laben for hyggelig og sosialt samvær. En spesiell takk vil jeg rette til Mona Gaarder, som alltid har tatt seg tid til å hjelpe og også ga meg god opplæring da jeg startet med arbeidet på laboratoriet.

Masterstudentene Rose-Marie S. Bekkevold, Annine T. Gjesvik og Ngoc Nguyen takkes for hyggelige samtaler både på lesesalen og på laboratoriet.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for all støtte og oppmuntring i året som har gått.

Oslo, mai 2011

Stine Malme

Sammendrag

Mitokondrier spiller en viktig rolle i nevronal skade og celledød. Ulike subpopulasjoner av mitokondrier antas å ha ulike egenskaper og påvirkning på disse prosessene. Ved nevronal celledød eller celleskade er glutamat ofte involvert og mitokondriepopulasjoner i rottekornceller påvirkes forskjellig ved glutamateksponering avhengig av hvor i cellen de er lokalisert.

For å separere mitokondrier og andre organeller fra hverandre ble det brukt en separasjonsmetode som separerer organeller på deres tetthet. De opparbeidete fraksjonene ble undersøkt for å finne ut hvor mye kjerner, mitokondrier og ER som var tilstede.

Organelleinnholdet ble kartlagt i kyllingkornceller, rottekornceller og PC12-celler.

Hastighetene ble optimalisert for hver celletype og tilsvarte 250g, 500g, 750g, 3000g, 6000g og 10000g. For å måle innholdet av ulike organeller ble cellene farget opp med trackere for mitokondrier, kjerner og ER. Deretter ble de separert og fluorescensen i fraksjonene avlest.

Fraksjonene ble også undersøkt ved hjelp av Westernanalyse med primærantistoffene HSP-60 og Lamin A/C. Det ble funnet mitokondrier i alle fraksjonene.

Organellefordelingen i fraksjoner fra glutamateksponerte rottekornceller og glukosedepriverte PC12-celler ble deretter undersøkt ved å bruke separasjonsmetoden. Det har tidligere blitt vist at glukosedepivering av PC12-celler fører til en ROS-avhengig celledød og dette ble valgt som celledødsmodell i PC12-celler. I disse forsøkene ble det, i tillegg til trackere for mitokondrier, kjerner og ER, også benyttet en tracker for å studere den mitokondrielle ROS-produksjonen. Det ble ikke funnet endringer i ROS-produksjonen eller i organellenes fordelingsmønster. Som celledødsmodell i rottekorncellene ble det valgt glutamateksponering. Det ble ikke funnet noen endringer i fordelingsmønsteret. Det ble også undersøkt om reparasjonsenzymet AP-endonuklease 1 (APE-1) var tilstede i rottekornceller ved hjelp av Westernanalyse. Det ble detektert et protein med riktig molekylvekt i et helcellelysat og i en glutamatbehandlet fraksjon ble det funnet dobbelt så mye APE-1 som i den tilsvarende ubehandlede fraksjonen. Det kan være en sammenheng mellom glutamatbehandling og APE-1 uttrykket.

Differensiell sentrifugering kan gi mye nyttig informasjon om organeller og kan benyttes for å undersøke subpopulasjoner av organeller og deres egenskaper.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	II
Sammendrag.....	III
1 Innledning.....	1
1.1 Litt om mitokondrier og andre organeller	1
1.2 Celledød.....	3
1.2.1 Nekrose.....	3
1.2.2 Apoptose.....	4
1.2.3 Dannelse av reaktive oksygenforbindelser.....	6
1.2.4 AP-endonuklease 1.....	7
1.3 Celledødsmodeller.....	9
1.3.1 Glutamat, eksitotoksitet og kornceller.....	9
1.3.2 Glukosedepriivering og PC12-celler	11
1.4 Fraksjonering av organeller	12
1.5 Mål med oppgaven	13
2 Materialer og metoder	14
2.1 Kjemikalier og biologiske produkter	14
2.2 Utstyr	17
2.3 Korncellekulturer.....	18
2.3.1 Coating av skåler.....	18
2.3.2 Preparering av cellekulturer	18
2.3.3 Utplating av cellekulturene	23
2.3.4 Bytte av medium og tilsetning av Ara-C.....	24
2.4 Glutamateksponering av rottekornceller	25
2.5 Deteksjon av celledød.....	27
2.6 Splitting av PC12-celler.....	28
2.6.1 Splitting til flaske	28
2.6.2 Splitting til skåler	29
2.7 Fluorescensmerking av organeller.....	30
2.7.1 Tillaging av fargereagenser.....	30
2.7.2 Tilsetning av fargereagenser til celler	31
2.8 Mikroskopering ved bruk av fluorescensmikroskop	32

2.9	Høsting og separering ved sentrifugering.....	33
2.9.1	Høsting	33
2.9.2	Opparbeidelse av organellefraksjoner ved sentrifugering.....	35
2.9.3	Måling av fluorescens i plateleser	36
2.10	Glukosedeprivering av PC12-celler	36
2.11	MTT-assay	37
2.12	Westernanalyse	38
2.12.1	Klargjøring og proteinmåling av prøvene	38
2.12.2	Støping av gel.....	40
2.12.3	Elektroforese	42
2.12.4	Blotting av gel over på membran	43
2.12.5	Blokkering og tilsetning av antistoff	44
2.12.6	Fremkalling	46
2.12.7	Stripping av membran	46
2.13	Databehandling og statistisk analyse	47
3	Resultater.....	48
3.1	Karakterisering av sentrifugeringsfraksjoner i ulike celletyper	48
3.1.1	Homogenisering	48
3.1.2	Farging av celler med ulike trackere	49
3.1.3	Rottekornceller	49
3.1.4	Kyllingkornceller	51
3.1.5	PC12-celler.....	56
3.2	Glutamateksponering av rottekornceller	60
3.3	Glukosedeprivering av PC12-celler.....	70
3.3.1	Celledød	71
3.3.2	MTT-assay	71
3.3.3	Morfologi	72
3.3.4	Fluorescensmåling med MT Green, MT Red, Hoechst og ER-tracker etter 4 timers glukosedeprivering	75
3.3.5	Fluorescensmåling med MT Green, MT Red, Hoechst og ER-tracker etter 24 timers glukosedeprivering	82
4	Diskusjon.....	91
4.1	Diskusjon av metoder	91

4.1.1	<i>In vitro</i> -modeller	91
4.1.2	Separasjonsmetoden	92
4.1.3	Analyse av fraksjonene	94
4.1.4	Farging med trypanblå	96
4.1.5	MTT-assay	97
4.2	Diskusjon av resultater	98
4.2.1	Innhold av organeller i fraksjonene.....	98
4.2.2	Glutamatbehandling av rottekornceller.....	100
4.2.3	AP-endonuklease 1 og rottekornceller	101
4.2.4	Glukosedepriivering av PC12-celler	102
5	Konklusjon	105
	Forkortelser	106
	Referanser.....	108

1 Innledning

For å fungere normalt er nevronene avhengig av flere ulike organeller, deriblant mitokondrier, endoplasmatisk retikulum og kjerner (1.1). Nevronal celledød (1.2) kan knyttes til utviklingen av sentralnervesystemet, men kan også være årsaken til flere neurodegenerative sykdommer. Mitokondriene kan knyttes til utviklingen av ulike sykdommer blant annet via dannelsen av reaktive oksygenforbindelser (ROS) (1.2.3). Dannelsen av ROS kan gi skader på DNA, men cellene har mekanismer for å reparere disse skadene (1.2.4). Det finnes ulike modeller for å indusere celledød *in vitro*. Man kan benytte seg av korncellekulturer og cellelinjer. Ved å benytte nevrotransmittoren glutamat (1.3.1) kan celledød induseres av eksitotoksisitet, en viktig prosess i patogenesen ved hjerneslag og ulike neurodegenerative sykdommer (Pivovarova and Andrews 2010). Ved hjerneslag vil blant annet tilgangen på næringsstoffer, som glukose, være nedsatt. Denne glukosemangelen vil indusere oksidativt stress og mitokondriell dysfunksjon i cellene (Liu, Song et al. 2003). Glukosedepriivering kan derfor benyttes som en celledødsmodell (1.3.2). Fordi ulike organeller kan bidra ulikt i celledødsprosesser, kan det være interessant å studere ulike subpopulasjoner. Ved å benytte ulike sentrifugeringsteknikker kan disse subpopulasjonene separeres fra hverandre (1.4).

1.1 Litt om mitokondrier og andre organeller

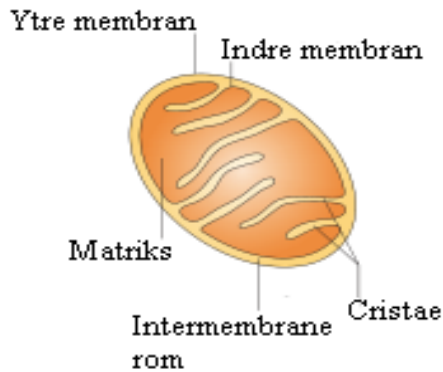
Mitokondrier er organeller som spiller en viktig rolle i flere cellulære prosesser. De er bygd opp av to membraner, en ytre membran og en indre membran (figur 1.1). Den indre membranen består av karakteristiske folder som kalles cristae. Disse foldene i membranstrukturen bidrar til det store overflatearealet til den indre membranen. Den ytre og indre membranen gjør det vanskelig å trenge inn i matriksen og fungerer som en barriere for passiv diffusjon av molekyler. Mitokondrier har et negativt membranpotensial (-180 mV) som opprettholdes av den indre membranen hvor det sitter protonpumper som danner en protongradient. Dette membranpotensialet er viktig for blant annet elektrontransportkjeden, ATP-syntesen og Ca^{2+} -homeostasen (Reers, Smiley et al. 1995; Yousif, Stewart et al. 2009). Mitokondrienes viktigste rolle er å forsyne cellen med energi, som dannes i form ATP og genereres ved oksidativ fosforylering (Cohen 2010; Westermann 2010). Når det dannes energi vil en lekkasje av elektroner forekomme og det vil kunne føre til dannelse av reaktive forbindelser, som blant annet er viktige komponenter i apoptoseprosessen (se 1.2.3) (Halliwell

1991; Cohen 2010). Mitokondriene er svært dynamiske organeller som kontinuerlig fusjonerer og deler seg og dette regulerer nøye antallet mitokondrier i en celle (Karbowski and Youle 2003; Chen and Chan 2009). Denne dynamikken gjør at mitokondriene kan danne store intracellulære nettverk. Celler med defekter som gjør at mitokondriefisjonen ikke fungerer, akkumulerer ofte mitokondrier i avgrensede områder i cellen slik at store områder forblir uten funksjonelle mitokondrier. Distribusjonen er avhengig av delingen som splitter opp nettverkene med mitokondrier til enheter som kan forflyttes. Dette er spesielt viktig i celler som nevroner (Westermann 2010). Mitokondrienes bevegelser i nevronet er en dynamisk prosess som påvirkes av endringer i synaptisk aktivitet. Det kan få mitokondriene til å endre morfologi og fordeling i aksoner og dendritter. Mitokondrienes bevegelse kan også hindres av glutamat (se 1.3.1) (Chang, Honick et al. 2006). Nevrodegenerative sykdommer, som for eksempel Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom og Alzheimers sykdom, har blitt knyttet opp mot mitokondriell dysfunksjon (Chen and Chan 2009).

Mitokondrier er heterogene. Det betyr at forskjellige mitokondriepopulasjoner har forskjellige egenskaper. Allerede på 1950-tallet ble det gjort studier på mitokondriefraksjoner fordi man mente mitokondriene kunne være ulike, og i 1977 ble det vist at fraksjonering av mitokondrier ga opphav til fraksjoner med ulik enzymaktivitet (Kuff and Schneider 1954; Wilkin, Reijnierse et al. 1979). Denne heterogeniteten i enzymer kan ses i nevronale mitokondrier. Det har blitt vist i serotonerge nevroner at monoamin oksidase B (MAO-B) finnes i mitokondrier som ligger i nærheten av cellekroppen mens de mitokondriene som befinner seg i aksonet mangler MAO-B (Arai, Karasawa et al. 2002). Perifere og kjernenære mitokondrier reagerer også forskjellig på toksisk glutamatbehandling og en økning i ROS-produksjonen kan da observeres i de perifere mitokondriene (Mathisen, Thorkildsen et al. 2007).

En celle har også andre organeller som deltar i celledød (se 1.2), blant annet endoplasmatisk retikulum (ER) og kjerner. ER er et av de viktigste stedene for proteinsyntese og proteinfolding. Disse prosessene er blant annet avhengig av ATP, Ca^{2+} og et oksidativt miljø for å fungere (Szegezdi, Logue et al. 2006). ER ble oppdaget i 1945 ved bruk av mikroskopi (Porter, Claude et al. 1945). Organellen består av fire hulerom avgrenset av membraner og kan deles inn i glatt ER (sER) og granulert ER (rER). rER har, i motsetning til sER, ribosomer på overflaten. Ulike deler av ER kan fusjonere med hverandre og det er viktig for dynamikken (Borgese, Francolini et al. 2006). Cellekjernene inneholder kromosomene og består av en ytre

og indre kjernemembran samt et perinukleært rom, porekomplekser og laminer. Den ytre kjernemembranen henger sammen med ER og er dekket med ribosomer (Gruenbaum, Wilson et al. 2000).



Figur 1.1: Oppbygningen til et mitokondrium. Mitokondriene består av en ytre og indre membran. Matriksen ligger innenfor den indre membranen, som består av mange folder, cristae, og har et stort overflateareal. Figuren er bearbeidet av forfatter og hentet fra: (Westermann 2010).

1.2 Celledød

Celledød kan kategoriseres i to hovedgrupper: nekrose og apoptose.

1.2.1 Nekrose

Nekrose er en mindre regulert og passiv form for celledød enn apoptose, og involverer en form for cellulær oppløsning (Wyllie, Kerr et al. 1980). Ved nekrose vil kromatinet klumpe seg sammen og organeller i cellen vil svelle. En viktig forskjell mellom nekrose og apoptose er at den ytre membranen løses opp, tap av membranintegritet, og de intracellulære organellene frigjøres ut i miljøet slik at cellene i området rundt den nekrotiske cellen også påvirkes. Dette fører med seg en inflammasjonsreaksjon som fjerner de døde cellene (Wyllie, Kerr et al. 1980; Okouchi, Ekshyyan et al. 2007).

1.2.2 Apoptose

Apoptose, eller programmert celledød, skjer blant annet under embryonal og postnatal utvikling. Den regulerer vev og cellers differensiering og er viktig for utviklingen av sentralnervesystemet. Apoptose kan også være en av årsakene til flere nevrodegenerative sykdommer hvor tap av nevroner er en av hovedårsakene til sykdommen. Eksempler på slike sykdommer er Parkinsons sykdom, Alzheimers sykdom og amyotrofisk lateralsklerose (Sastry and Rao 2000; Mattson 2006). Apoptose kjennetegnes blant annet av at cellene krymper, kromatinet kondenseres og DNA fragmenteres. Celler som har gjennomgått apoptose, danner apoptotiske legemer som fagocyteres av makrofager. Det settes dermed ikke i gang noen inflammasjonsrespons slik som ved nekrose. Apoptose er en prosess som krever energi i form av ATP, og cellene har en terskelverdi for når de kan sette i gang apoptosen. Dersom cellen har mistet mye ATP vil nekrose velges fremfor apoptose (Wyllie, Kerr et al. 1980; Mattson 2006; Okouchi, Ekshyyan et al. 2007).

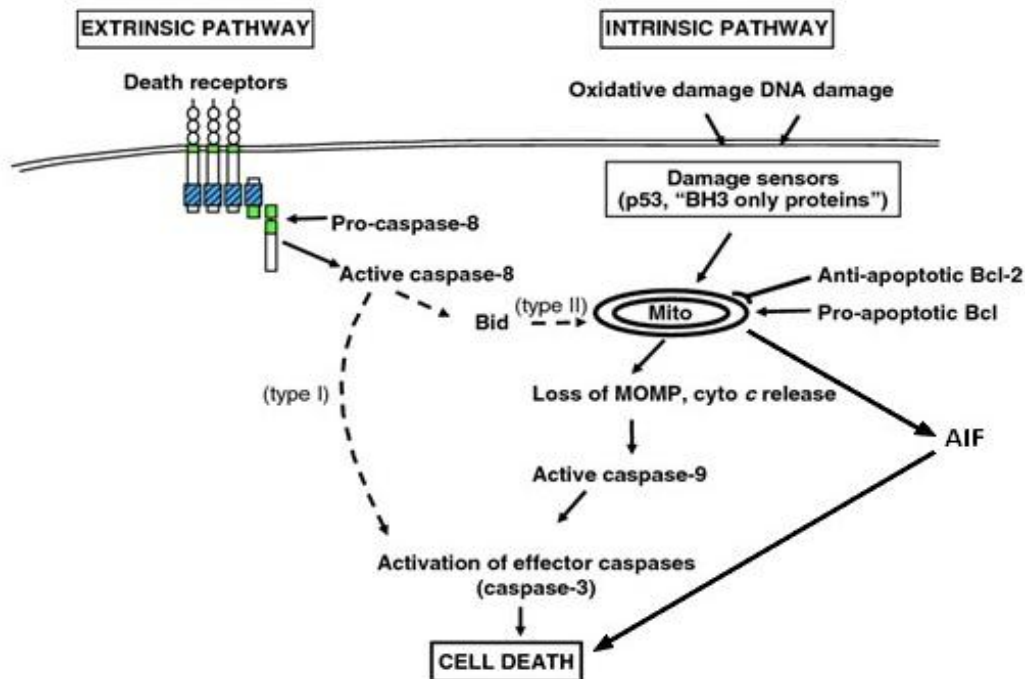
Apoptose settes i gang som en respons på signaler som kommer utenifra eller innenifra cellen, og medieres via den ytre signalveien (dødsreseptormediert apoptose) eller den indre signalveien (mitokondriemediert apoptose) (figur 1.2). De ytre signalene involverer aktivering av dødsreseptorer (TNF-, Fas- og TRAIL-reseptorer) ved at ligand bindes. Det vil føre til rekruttering av proteiner ved dødsdomenet i cytosol og signalering via kaskader av protein-interaksjoner. Dødsreseptorene sender signaler fra overflaten av cellen til den indre signalveien når ligand bindes. Ligandene som bindes til reseptorene tilhører tumornekrosefaktor (TNF)-superfamilien av cytokiner (TNF- α og Fas ligand). De indre signalene involverer mitokondrier og frigjøring av pro-apoptotiske faktorer i cytosol, noe som fører til aktivering av caspaser. Det pro-apoptoiske proteinet Bid virker som en forbindelse mellom den ytre og indre signalveien ved at caspase 8, som aktiveres av den ytre signalveien, kløyver proteinet og dermed setter i gang mitokondriesignaleringen. Begge apoptoseveiene resulterer i aktivering av effektorcaspasene 3,6 og 7 (Okouchi, Ekshyyan et al. 2007; Reyland and Bradford 2010).

Ytre stimuli, ROS, DNA-skade og Fas-signalering, kan sette i gang den mitokondriemedierte apoptosen. Denne prosessen resulterer i utslipp av små pro-apoptotiske proteiner som mitokondriene lagrer i det intermembrane rom. Eksempler på slike proteiner er cytokrom c og AIF. I cytosol kan cytokrom c aktivere en caspase-avhengig signalvei og AIF kan aktivere en

caspase-uavhengig signalvei. I den caspase-avhengige signalveien danner cytokrom c et kompleks med Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor), og det fører til dannelse av et apoptosom, som fungerer som et caspase-aktiverende kompleks. Dette aktiverer pro-caspase 9 som igjen vil aktivere caspase 3. Videre vil dette føre til DNA fragmentering (Joza, Susin et al. 2001; Okouchi, Ekshyyan et al. 2007). AIF finnes til vanlig i det intermembrane rommet slik som cytokrom c, men når det sendes apoptosesignaler vil AIF, i motsetning til cytokrom c, translokere til kjernen og indusere apoptoseliknende endringer i kjernen som DNA fragmentering og delvis kromatinkondensering (Daugas, Susin et al. 2000).

ER kan også bidra i apoptoseprosessen. Akkumulering og aggregering av feilfoldete proteiner i ER kan føre til ER-stress og dersom dette stresset vedvarer vil cellene gå i apoptose. Flere patofysiologiske tilstander er knyttet til ER-stress og ER-dysfunksjon (Paschen and Douthail 1999; Szegezdi, Logue et al. 2006). ER kan indusere apoptose på to ulike måter. Den ene måten fører til aktivering av caspase 12 som videre vil aktivere caspase 3 (Kaufman 1999; Ward, Kogel et al. 2004). Den andre måten vil indusere den mitokondrielle apoptoseveien som resulterer i frigjøring av cytokrom c. Her spiller det pro-apoptotiske proteinet Bcl-2 en viktig rolle (Hacki, Egger et al. 2000; Ward, Kogel et al. 2004). Bcl-2 regulerer blant annet frigjøring av Ca^{2+} fra det intracellulære lageret i ER og sender signaler om ER-stress til mitokondriene. Ca^{2+} -lageret opprettholdes av IP_3 -reseptoren, som vil frigjøre Ca^{2+} når den stimuleres, og av Ca^{2+} -ATPasen, som frakter Ca^{2+} tilbake til cellen (Paschen and Douthail 1999). Som et resultat av Ca^{2+} -innfluks vil arakidonsyre og ceramid produseres av fosfolipase A. Dette vil indusere ROS-produksjon, frigjøring av Ca^{2+} fra ER, opptak av Ca^{2+} i mitokondriene og apoptose (Hussain and Ramaiah 2007).

Ulike subpopulasjoner av mitokondrier bidrar ulikt i apoptoseprosessen. Det dannes to subpopulasjoner som har ulik evne til å frigjøre cytokrom c og danne ATP. I den ene subpopulasjon vil membranpotensialet gå tapt og føre til frigjøring av cytokrom c. I den andre subpopulasjonen vil ikke membranpotensialet tapes og mitokondriene vil være funksjonelle. Cytokrom c vil i denne subpopulasjonen ikke frigjøres før kromatinet er kondensert og kjernen fragmentert. Det betyr at ATP cellen trenger for å fullføre apoptoseprosessen kan dannes av en funksjonell subpopulasjon med mitokondrier (D'Herde, De Prest et al. 2000; Krysko, Roels et al. 2001).



Figur 1.2: Oversikt over apoptotiske signalveier. Den ytre signalveien medieres via dødsreseptorer og den indre signalveien medieres via mitokondrier. Både den ytre og den indre signalveien kan føre til caspase-aktivering. Den indre signalveien kan også aktivere en caspase-uavhengige signalvei som går via AIF. Figuren er bearbeidet av forfatter og hentet fra (Reyland and Bradford 2010).

1.2.3 Dannelse av reaktive oksygenforbindelser

ROS er frie radikaler og oksygenforbindelser med høy reaktivitet. I kroppen er det en konstant nydannelse av radikaler, men de fleste av disse vil ikke føre til skade fordi de nøytraliseres av kroppens antioksidantforsvar. ROS produseres i organeller i cellene og mitokondriene er en av de viktigste produsentene. ER kan også danne ROS ved hjelp av arakidonsyre som finnes i membranen. Mitokondriene deltar i tre viktige cellulære prosesser: Energiproduksjon, dannelse av ROS og apoptose. ROS kan gi DNA-skade og det er nok til å indusere apoptose. For å hindre en opphopning av DNA-skader har cellene ulike reparasjonsmekanismer (Halliwell 1991; Fleury, Mignotte et al. 2002; Yang, Weissman et al. 2008; Cohen 2010). Mitokondrienes energiproduksjon, den oksidative fosforyleringen, fører til en lekkasje av elektroner som kan danne ROS (Halliwell 1991). I mitokondriene finnes det mye superoksid, et biprodukt av oksidativ fosforylering. Superoksidet kan gjøre skade på DNA i mitokondriene, men ved normale tilstander vil superoksidet uskadeliggjøres ved at det dannes hydrogenperoksid, en reaksjon som er katalysert av superoksid dismutase.

Hydrogenperoksidet som dannes vil kunne reagere med kobberioner eller jernioner og danne hydroksyl, en forbindelse som er svært skadelig for mitokondrienes DNA (mtDNA).

Hydroksyl kan indusere lipidperoksidering av cellulære membraner og gi dannelse av 4-hydroksynonenal (4-HNE), et aldehyd som er blitt koblet til flere nevrodegenerative sykdommer. Nitrogenoksid kan reagere med hydroksyl eller superoksid og danne peroksynitritt. Peroksynitritt virker blant annet ved å gi en irreversibel hemming av mitokondrierespirasjonen og skade komponenter i mitokondriene (Fleury, Mignotte et al. 2002; Yang, Weissman et al. 2008).

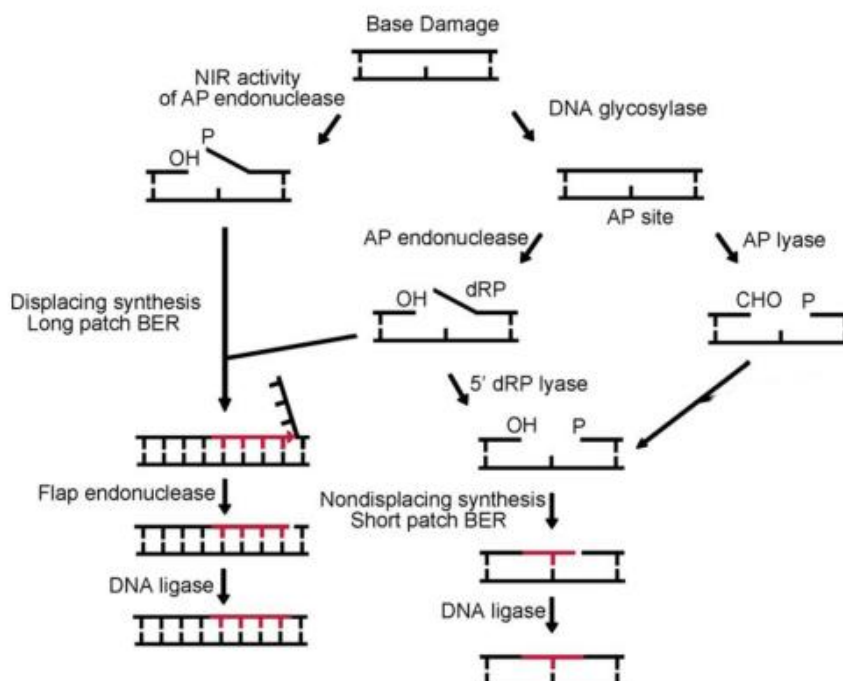
1.2.4 AP-endonuklease 1

mtDNA er i mye høyere grad enn nukleært DNA (nDNA) eksponert for oksidativ fosforylering og dermed også mer utsatt for oksidativ skade. Fosforyleringen gir biprodukter som ikke kan unngås, ROS (se 1.2.3). ROS kan lekke ut og reagere med cellulære komponenter, men det er det mitokondrielle DNAet som er mest utsatt. mtDNA akkumulerer mutasjoner 10-50 ganger raskere enn nDNA. Mitokondriene er hovedforbrukerne av oksygen og de er hovedskaperne av ROS i en celle. Interessen for mitokondrier og mutasjoner i mtDNA har i de siste årene økt ettersom man har fått mer kunnskap om deres påvirkning og rolle ved patologiske tilstander (Bogenhagen, Pinz et al. 2001; Liu and Demple 2010). Reparasjon av DNA-skader er viktig for å vedlikeholde genomer og for å uttrykke funksjonelle proteiner. DNA-skade kan føre til unormal proteinproduksjon som en respons på alkylering og oksidativt stress. Skader som ikke reparerer kan påvirke nevroner (Fishel, Vasko et al. 2007).

AP-endonuklease 1 (APE-1) er et viktig og flerfunksjonelt protein som har betydning for reparasjon av skader på DNA via base excision repair (BER)-veien i både kjerner og mitokondrier. BER-veien er den vanligste måten å reparere DNA-skader på enkeltbaser blant annet induisert av oksidering, deaminering og alkylering. Reparasjonen deles inn i SP-BER (short patch) og LP-BER (long patch) (figur 1.3) (Chattopadhyay, Wiederhold et al. 2006; Bhakat, Mantha et al. 2009; Tell, Quadrifoglio et al. 2009; Liu and Demple 2010). Når ROS dannes i en celle vil det føre til oksidative skader på DNA. Disse endringene kan være alt fra uskadelige til mutagene og karsinogene. APE-1 vil koordinere den cellulære responsen på den oksidative skaden cellen er utsatt for (Demple and Sung 2005; Tell, Quadrifoglio et al. 2009). Reparasjon via BER-veien starter når DNA glykosylase oppdager en baseskade. DNA

glykosylase vil da kløyve glykosidbindingen mellom basen og sukkerringen. Stedet som kløyves kalles et AP-sete. APE-1 vil så kløyve et sukkerfosfatbånd på AP-setet, noe som gir et enkelttrådet brudd med 3' hydroksyl og 5' deoksyribosefosfat (dRP) som vil repareres via SP-BER eller LP-BER. SP-BER er en mononukleotid-prosess hvor DNA polymerase og DNA ligase vil fullføre oppgaven ved å reparere nukleotidbruddet. LP-BER er en multinukleotid-prosess hvor 5' enden kløyves av FEN-1 (flap endonuclease 1) og DNA ligase fullfører reparasjonen av kjeden (Seeberg, Eide et al. 1995; Demple and Sung 2005; Daley, Zakaria et al. 2010).

Uttrykket av APE-1 har også vært knyttet til patologiske tilstander deriblant neurodegenerative sykdommer og ulike krefttyper (Tell, Quadrifoglio et al. 2009). Den eksitotoksiske effekten av glutamat (se 1.3.1) fører til rask skade på nevroner og denne glutamatinduserte DNA-skaden fører til en nevronal økning i APE-1-nivåene (Yang, Tadokoro et al. 2010). Mye av informasjonen man i dag har om DNA-reparasjon er innhentet ved å studere ikke-nevronale celletyper, slik at reparasjonsmekanismene som er i bruk i nevroner under fysiologiske og patologiske forhold fortsatt, i stor grad, er ukjent. Studier har vist at APE-1 uttrykkes i hjernen (Englander 2008; Yang, Tadokoro et al. 2010).



Figur 1.3: Reparasjon av baseskader via BER-veien. Figuren viser hvordan skader på baser repareres via BER-veien. De repareres enten via SP-BER eller LP-BER. Figuren er bearbejdet av forfatter og hentet fra: (Daley, Zakaria et al. 2010).

1.3 Celledødsmodeller

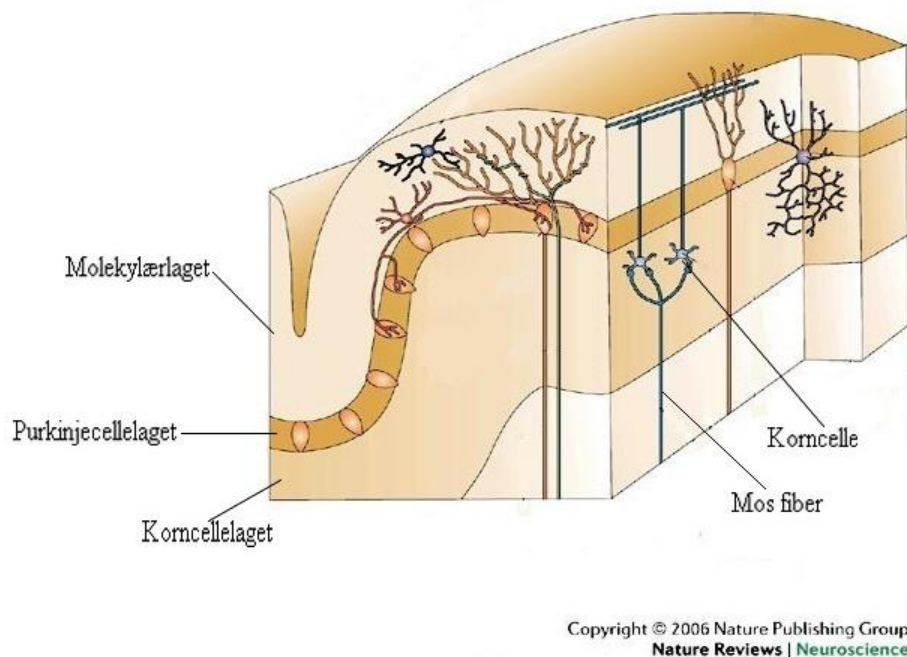
Mangel på oksygen i hjernen ved akutt hjerneslag er en av de største dødsårsakene i verden (WHO 2006). Det finnes i dag flere teorier på mekanismene som ligger til grunn for den nevronale skaden, blant annet dannelse av ROS, eksitotoksistet og endringer i kalsium- og natrium innfluks (Singh, Siddiqui et al. 2009). Det finnes to typer hjerneslag. Den vanligste (omtrent 85 % av tilfellene) skyldes tap av blodgjennomstrømning, ofte forårsaket av en blodpropp eller embolisme. Den andre typen skyldes en blødning hvor en blodåre på overflaten av hjernen eller i hjernen sprekker. Når blodgjennomstrømningen stoppes eller hindres, vil det føre til en nedgang i oksygentilførselen samt tilførsel av andre næringsstoffer til hjernen og området som er rammet (Green and Shuaib 2006). For å undersøke hvordan celler reagerer på eksitotoksistet kan man glutamateksponere dem, mens fjerning av glukose vil gi informasjon om hvordan de reagerer når tilførselen av næringsstoffer stoppes.

1.3.1 Glutamat, eksitotoksistet og kornceller

Lillehjernen, *cerebellum*, er en del av hjernen som befinner seg bak pons og medulla. Den består av to hemisfærer, som er forbundet av et vev kalt *vermis*, og er viktig for regulering av blant annet motorisk koordinering, balanse og kognitive funksjoner. I den senere tid har lillehjernen også blitt knyttet til effekter på emosjon. Skader på lillehjernen kan føre til tap av normalt atferdsmønster og motorisk koordinasjon (Valenzuela, Lindquist et al. 2010).

Lillehjernebarken består av tre lag: molekulærlaget, purkinjelaget og granulærlaget/korncellelaget (figur 1.4). Det er totalt 50 milliarder nevroner i lillehjernebarken, noe som representerer halvparten av nevronene i hjernen. Korncellene, som finnes i korncellelaget, utgjør totalt over 90 % av lillehjernen nevroner og er den største homogene nevronpopulasjonen i hjernen (Contestabile 2002; Ramnani 2006). Det ytterste laget, molekulærlaget, inneholder GABAerge internevroner, som kurvceller og stjerneceller, og aksoner og dendritter som har sitt utspring i de dypere lagene i lillehjernen. I purkinjelaget, det midterste laget, finnes purkinjecellene (Contestabile 2002). Korncellene blir dannet i det ytre laget i lillehjernen, germinallaget, og migrerer så videre gjennom molekulærlaget og inn til korncellelaget. Når korncellene migrerer, legger de igjen parallellfibrene øverst i molekulærlaget, på toppen av tidligere dannede fibere. Dermed opprettholdes det en gradient. De modne parallellfibrene ligger nederst mens de nydannede befinner seg øverst (Burgoyne

and Cambray-Deakin 1988). I forskningen brukes kornceller til å studere mekanismer knyttet til nevronal celledød, funksjon og utvikling. Kornceller uttrykker NMDA-reseptorer og kan brukes til å studere glutamateffekter på lillehjernen (Burgoyne and Cambray-Deakin 1988; Popp, Reneau et al. 2008).



Figur 1.4: Lillehjernens anatomi. Korncellene har migrert gjennom molekylærlaget og purkinjecellelaget. Figuren er bearbeidet av forfatter og hentet fra: (Ramnani 2006).

Glutamat er en aminosyre og den viktigste eksitatoriske nevrotransmittoren i hjernen. Effektene av glutamat er knyttet til motorisk funksjon, læring og hukommelse og synaptisk plastisitet. Nevrotransmittoren kan også virke toksisk på cellene i nervesystemet. Dette kalles eksitotoksitet og ble første gang beskrevet i 1969 (Olney and Sharpe 1969; Mark, Prost et al. 2001). En ubalanse i dette systemet vil kunne føre med seg en rekke problemer. Eksitotoksiteten har blitt knyttet opp til patogenesen ved hjerneslag og flere andre neurodegenerative sykdommer (Choi 1985; McEntee and Crook 1993; Lipton and Rosenberg 1994; Mark, Prost et al. 2001).

Glutamat interagerer med glutamatreseptorer som finnes i sentralnervesystemet. Hovedlokasjonen til disse reseptorene er på pre- og postsynaptiske nevroner. De deles inn i metabotrope (G-proteinkoblede) og ionotrope (ligandstyrte ione kanaler) reseptorer. De

metabotrope reseptorene, som først ble beskrevet på 1980-tallet, virker ved at de enten er knyttet til produksjon av inositol trifosfat, og påfølgende frigjøring av Ca^{2+} , eller til en hemming av adenylat syklase. De ionotrope reseptorene er direkte koblet til ionekanaler i membranen. Det finnes tre typer ionotrope glutamatreseptorer som er oppkalt etter agonistene som stimulerer dem: AMPA, kainat og NMDA (Meldrum 2000; Mark, Prost et al. 2001).

NMDA-reseptorene består av flere subenheter fra tre genfamilier, NR1, NR2 og NR3. De er ligandstyrte kationkanaler som slipper Ca^{2+} og Na^+ inn i cellen mens K^+ slippes ut når de aktiveres. For at reseptoren skal aktiveres må både glutamat og ko-agonisten glysin bindes til sine respektive seter. Under fysiologiske forhold vil kanalen være blokkert av Mg^{2+} , men når cellen depolariseres opphører denne blokkeringen og ionekanalene åpner seg slik at ioner kan passere. En overaktivering av NMDA-reseptorene vil føre til innfluks og økte mengder intracellulær Ca^{2+} . De økte Ca^{2+} -mengdene som følger etter overstimulering av NMDA-reseptoren kan være toksisk for nevronene (Meldrum 2000; Mark, Prost et al. 2001). Cellene dør via nekrose eller en forsinket form for apoptose avhengig av eksponeringen. I studier gjort i nevronkulturer har det blitt observert at en liten subpopulasjon av nevroner vil dø en nekrotisk død rett etter toksisk glutamateksponering (100 μM – 3 mM), mens de nevronene som overlever denne fasen, dør via apoptose på et senere tidspunkt. Den mitokondrielle aktiviteten er nødvendig for at nevronene skal dø via apoptose. De nevronene som døde en nekrotisk død rett etter eksponeringen tapte raskt sitt membranpotensial og ATP-produksjonen ble redusert. Nevronene som overlevde denne fasen gjenvant sitt membranpotensial og døde en apoptotisk død senere (Ankarcrona, Dypbukt et al. 1995; Bonfoco, Krainc et al. 1995; Greenwood and Connolly 2007). Mitokondrier har stor kapasitet til å ta opp Ca^{2+} . Ved å hemme mitokondrienes Ca^{2+} -opptak vil cytoplasmas Ca^{2+} -innhold øke, men den nevronele celledøden vil reduseres. Det viser at mitokondrienes Ca^{2+} -opptak er essensielt for å indusere en eksitotoksisk glutamatdød (Stout, Raphael et al. 1998). Glutamat stimulerer dannelsen av ROS og mitokondriene antas å være det viktigste stedet denne ROS-produksjonen foregår (Reynolds and Hastings 1995).

1.3.2 Glukosedeprivering og PC12-celler

Kreftcellelinjen PC12-celler, som kommer fra et feokromocytom fra binyrene hos rotter, er celler som syntetiserer og frigjør katekolaminer. Denne cellelinjen kan brukes som en nevronele *in vitro*-modell ved studier av blant annet hjerneslag (Greene and Tischler 1976; Liu,

Song et al. 2003). Ved å fjerne glukose vil man kunne få en enkel modell på hva som skjer med hjernen når blodgjennomstrømningen er hindret. Modellen kan også brukes til å undersøke legemidler med potensielt nevrobekyttende effekter. Skaden som oppstår ved glukosedepriivering skyldes hovedsakelig akkumulering av ROS og flere studier har rapportert om en økning i ROS-produksjon ved glukosedepriivering (Liu, Song et al. 2003; Isaev, Stelmashook et al. 2008). Men glukose er ikke bare viktig i patogenesen ved hjerneslag. Ved den neurodegenerative sykdommen Alzheimers har det blitt vist at et redusert glukoseopptak og avleiring av amyloid- β -peptidet forekommer. Amyloid- β hemmer transporten av glukose via en mekanisme som involverer oksidative skader på den nevronele glukosetransportøren GLUT 3. Glukosedepriivering fører til lipidperoksidering av plasmamembraner og et aldehydprodukt (4-HNE), som dannes under lipidperoksideringen, hemmer glukosetransporten og fører til reduserte nivåer av ATP i cellene. Når nevronene ikke får nok glukose vil mitokondrieproduksjonen av ATP undertrykkes og nevronenes sårbarhet for eksitokosiske Ca^{2+} -nivåer vil øke. Også amyotrofisk lateralsklerose har blitt knyttet til lipidperoksidering og etterfølgende ATP-reduksjon (Mark, Pang et al. 1997; Liu, Song et al. 2003).

Glukosemetabolismen kan styre balansen mellom liv og død for en celle. Ved glukosedepriivering vil en mild til moderat nedgang i ATP, som er en konsekvens av redusert glukoseopptak, kunne sette i gang den mitokondrielle døds-kaskaden. En kraftig reduksjon i ATP vil føre til nekrose fordi apoptoseprosessen er avhengig av ATP for å kunne gjennomføres. I tillegg vil et redusert glukoseopptak føre til oksidativt stress, noe som vil medføre en endring i cellenes redoksstatus, slik at stressresponser og signalveier som fører til celledød aktiveres. Glukosedepriivering gir både en nekrotisk og apoptotisk celledød, noe som er forenelig med mekanismene bak hjerneslag (Li, Chopp et al. 1995; Moley and Mueckler 2000).

1.4 Fraksjonering av organeller

Ulike sentrifugeringsteknikker for å studere ulike organeller har vært brukt i mange år. I tiden etter 2.verdenskrig og frem til i dag har dette vært et felt i stadig utvikling. I 1869 ble de første kjernene isolert fra cytosol ved hjelp av sentrifugering (De Duve and Beaufay 1981). På 1930-tallet gjorde man forsøk på å fraksjonere og analysere mitokondrier og mikrosomer i tumorceller. Senere brukte man en liknende metode på prøver fra både rottelever og human

lever. Prøvene ble homogenisert og fraksjonert, og leverhomogenatet dannet kjerne-, mitokondrie-, mikrosom- og supernatantfraksjoner (Bjorntorp, Bjorkerud et al. 1965; De Duve and Beaufay 1981). Metoden ble senere brukt i andre celletyper, blant annet celler fra lillehjernen hos rotter, hvor organeller ble separert i fraksjoner. Synaptosomer og mitokondriell heterogenitet ble da undersøkt (Wilkin, Reijnierse et al. 1979). På 1970-tallet ble separasjonsteknikker benyttet for å isolere nevronfraksjoner og astrocyttfraksjoner fra rotte (Farooq and Norton 1978).

For å separere mitokondrier har gradientsentrifugering vært mye brukt, ofte i kombinasjon med differensiell sentrifugering. Differensiell sentrifugering vil føre til at hele celler og kjerner kommer ut i den første fraksjonen og cytoplasma i den siste fraksjonen. Men disse fraksjonene vil inneholde andre organeller. Gradientsentrifugering vil gi veldig rene fraksjoner, men prosedyren er svært tidkrevende. I gradientsentrifugering benyttes det en bufferløsning med en gradient som gjør at de ulike organellene legger seg i ulike lag. Disse lagene må deretter tappes med en sprøyte. Gradientløsningene som først ble utviklet var sukrosegradienter. Disse sukrosegradientene gjorde forholdene hypertone og mitokondrienes egenskaper ble dårlig ivaretatt fordi forholdene var ufysiologiske (Sims 1990; Kristian 2010). Det finnes to nyere gradientløsninger hvor dette unngås, Percoll og Ficoll (Clark and Nicklas 1970; Kristian 2010). I dag finnes det mange ulike protokoller for isolering av organeller, deriblant isolering av mitokondrier fra sentralnervesystemet. De fleste av disse protokollene innebærer gradientsentrifugering (Kristian 2010). Protokoller for differensiell sentrifugering finnes for tre ulike vev: lever, hjerte og skjelettmuskulatur. I disse protokollene beskrives det hvordan man kan danne fraksjoner med ulike organeller som for eksempel mitokondrier og peroksisomer (Graham 2001b; Graham 2001c).

1.5 Mål med oppgaven

Målet med denne oppgaven var å:

- Undersøke innholdet av mitokondrier, kjerner og ER i fraksjoner opparbeidet ved hjelp av differensiell sentrifugering i rottekornceller, kyllingkornceller og PC12-celler.
- Sammenlikne bruk av trackere og Westernanalyse.
- Undersøke om separasjonsmønsteret til organeller i rottekornceller og PC12-celler endres etter celledødsstimulus.
- Undersøke tilstedeværelse av AP-endonuklease 1 i rottekornceller.

2 Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier og biologiske produkter

I denne tabellen følger en liste over kjemikalier og biologiske produkter brukt i oppgaven.

Produkt	Produsent
Adenosin 5'-trifosfat (ATP). Opphav: bakterielt	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Akrylamid (30 %)	Bio-Rad, Hercules, USA
Albumin (BSA), fra serum, bovint	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Albumin (BSA), fra serum, bovint. Fettfri	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Antistoff, primær, HSP-60	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Antistoff, primær, Lamin A/C	Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA
Antistoff, primær, Ref-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Antistoff, primær, β -aktin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Antistoff, sekundær, anti-geit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Antistoff, sekundær, anti-mus	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Antistoff, sekundær, anti-kanin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA
Bromfenolblå	Merck, Darmstadt, Tyskland
Cytosin- β -D-arabino-furanosid (Ara-C)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Deoxyribonuklease 1 (DNase 1).	
Opphav: bovint	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dimetylsulfoxid (DMSO) - CAS# 67-68-5	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	
No Glucose 1X	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Etylendiamintetraeddiksyre dinatriumsalt (EDTA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Etylenglykoltetraeddiksyre (EGTA)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

ER-Tracker™ Blue-White DPX	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fenolrød	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glukose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glutamat (L-glutamat)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glutamin (L-glutamin)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glyserol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glysin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
HEPES (4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hesteserum	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Hoechst	Invitrogen, Carlsbad, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Isopropanol	Kemetyl, Norge
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumhydroksid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid	Koch-Light laboratories, England
Kalsiumklorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kalveserum, føtalt (FBS)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Magnesiumkloridheksahydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Magnesiumsulfat	Merck & Co, New Jersey, USA
Mannitol (D-Mannitol)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol	VWR, Pennsylvania, USA
MitoTracker® Green FM	Invitrogen, Carlsbad, USA
MitoTracker® Red CM-H ₂ XROS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Modified 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)	Calbiochem, San Diego, USA
Natriumhydrogenfosfatdihydrat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumpyruvat	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumselenitt	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA
Poly-L-lysin hydrobromid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Prescision Plus™ Protein Standard	Bio-Rad, Hercules, USA
Putrescin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA
Saltsyre (HCl), konsentrert	Merck, Darmstadt, Tyskland
SDS (natriumlaurylsulfat)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Sukrose	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
SuperSignal® West Femto	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperSignal® West Piko	Pierce Thermo Scientific, Rockford, USA
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamd)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Transferrin, humant.	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trijodtyronin (T ₃)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris/Glycin Buffer (TG) 10 X	Bio-Rad, Hercules, USA
Tris/Glycin/SDS Buffer (TGS) 10 X	Bio-Rad, Hercules, USA
Trisbase (tris(hydroxymetyl)aminometan)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsininhibitor	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge
Tween 20	Calbiochem, San Diego, USA
Vitamin C (L-ascorbic acid)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Vitamin E ((±)α-Tocopherol)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

2.2 Utstyr

I denne tabellen følger en liste over utstyr benyttet i denne oppgaven.

Utstyr	Type og produsent
Avtrekkskap	Normodul Lab 2000
Celleflasker og celleskåler, sterile	Nunclon
Inkubatorskap, cellekulturer	Termo Forma, Steri-Cycle
Inkubatorskap, cellelinjer	Forma Scientific
Kamera fluorescensmikroskop	Nikon Digital Sight DSQiMc
Kanyler, sterile	BD Microfine
LAF-benk	Holten Safe 2000 Model 1.2
Mikroskop, fluorescens	Nikon Eclipse TE 300 DV
Mikroskop, lys	Nikon TMS type 104
pH-meter	RCT Basic, IKA Labortechnik
Pipetboy	Integra Bioscience
Pipetter	Thermo Scientific
Pipettespisser (1-1000 µL)	Bioclean
Pipettespisser (5 mL, 10 mL og 25 mL)	Corning Incorporated, Corning, USA
Plate med 96 brønner, blank og hvit	Nunclon
Plateleser	HTS 7000 Plus Bio-Assay Reader, Perkin Elmer
Rugemaskin	Covatutto 54, Novital
Sentrifuge, cellelab	Kubota 2010
Sentrifuge, kjølig	Biofuge Fresco, Heraeus Instruments
Sprøyter, sterile	BD Plastipak
Tellekammer	Bürcher
Vannbad	SUB Aqua 12, Grant
Vekt	Mettler Toledo Basbal
Vekt, fin	Mettler Toledo AB54-S
Western filterpapir	Bio-Rad
Western fremkallingsmaskin	Syngene
Western geloppsatsutstyr	Bio-Rad
Westernmembran	Bio-Rad

2.3 Korncellekulturer

2.3.1 Coating av skåler

Skålene som skal brukes til cellekulturene coates med en polymer for at cellene skal oppnå bedre kontakt med plastbunnen. Coatingen må skje før preparering og utsåing av cellekulturene.

Prosedyre for coating:

- 1) En flaske 5 mg poly-L-lysin hydrobromid tilsettes 10 mL autoklavert MQ-vann. Løsningen blandes godt.
- 2) Løsningen fortynnes før tilsetning til skåler ved at det tilsettes MQ-vann i forholdet 1:50 slik at den endelige konsentrasjonen blir 0,01 mg/mL.
- 3) Polymerløsningen tilsettes skålene.
 - Små skåler (d= 4,0 cm) tilsettes 1 mL polymerløsning.
 - Mediumskåler (d= 6,0 cm) tilsettes 2 mL polymerløsning.
 - Store skåler (d= 9,2 cm) tilsettes 5 mL polymerløsning.Skålen beveges forsiktig slik at hele bunnen dekkes.
- 4) Etter ca 1 time pipetteres løsningen av. Bruk 1000 µL pipette med smal spiss slik at så mye av løsningen som mulig blir pipettert av.
- 5) Skålene settes til tørking i LAF-benken med maksimal styrke på luftstrømmen. Coating bør skje dagen før prepareringen slik at skålene kan tørke over natt. Det er også mulig å coate to dager før eller morgenen før prepareringen. Coates skålene samme dag er det viktig at de ikke har synlige polymerløsningsrester igjen før prepareringen.

2.3.2 Preparering av cellekulturer

I forsøk med kylling blir det benyttet befruktede egg fra Nortura Samvirkekylling i Våler. Eggene oppbevares i kjøleskap i inntil 5 dager før de legges til inkubering ved 37 °C i rugemaskin i 17-18 dager. På dag 17-18 prepareres kyllingene.

I forsøk gjort med rottekornceller er det benyttet kornceller fra Wistar hannrotter fra Charles River Laboratories i Tyskland. Dyrene oppbevares i dyrestallen på Folkehelseinstituttet i Oslo. Her avlives rottene 7 dager etter fødsel. Hodene fraktes til Blindern på is og korncellene prepareres. Kylling og rotte prepareres i prinsippet på samme måte.

Prosedyre for cellekulturpreparering for kylling og rotte (punkt 2-4 gjelder kun kylling):

- 1) Utstyr settes inn i LAF-benken (tabell 2.1). Vannbadet settes på 37 °C. Løsninger lages og sterilfiltreres (tabell 2.2 og tabell 2.3).
- 2) Is legges i en bolle og egg hentes. Deretter fylles isbollen med vann.
- 3) Eggene overføres til isvann i 7 minutter for at kyllingene skal bedøves.
- 4) Eggene tas ut av vannet, rulles i sprit og åpnes over en petriskål. Kyllingene dekapiteres med en skalpell et stykke ned på halsen. Hodene legges over i en ren petriskål og flyttes deretter til LAF-benken. Resten av avfallet kastes i en egen risikoavfallsboks.
- 5) I LAF-benken tas lillehjernen ut ved hjelp av en steril saks og pinsett. Det klippes i en sirkulær bevegelse rundt halve hodet (fra åpningen til ryggmargen i bakhodet). Skalletaket kan da løftes av og lillehjernen, som har en stripete struktur, kan forsiktig tas ut.
- 6) Lillehjernene overføres til en stor petriskål med løsning 1 (tabell 2.3).
- 7) Strukturer som ikke er fra lillehjernen fjernes. Deretter fjernes hjernehindene ved å nappe i endene med sterile pinsetter. Lillehjernene overføres så til en ny ren skål med løsning 1.
- 8) Lillehjernene samles på midten av petriskålen og deles opp i små biter ved at de kuttes vertikalt og horisontalt.
- 9) Ved hjelp av en pipette overføres hjernebitene til et rør (50 mL) med 10 mL løsning 1. Petriskålen kan eventuelt vaskes med løsning 1 for å få med alle bitene.
- 10) Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt.
- 11) Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i 15 mL av løsning 2 (tabell 2.3) og overføres til en trypsineringsflaske med løsning 2. Flasken settes på vannbad (37 °C i 15 min). Korkene (to per flaske) skal sitte løst på for at cellene skal få luft. Flasken rystes forsiktig hvert 1.-3. minutt.
- 12) Løsningen overføres, ved hjelp av en pipette, til et nytt rør (50 mL) som inneholder 15 mL løsning 4 (tabell 2.3). Under pipetteringen ønsker man å få med minst mulig av løsningen og mest mulig av cellene. Røret fylles så helt opp med løsning 4 og vendes noen ganger for blanding.
- 13) Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter.

- 14) Supernatanten pipetteres av og pelleten resuspenderes i 3 mL løsning 3 (tabell 2.3). En glasspipette brennes av og løsningen med cellene homogeniseres ved at man trekker den opp og ned med pipetten 20-30 ganger til man har en jevn celleduspensjon.
- 15) Røret settes i ro en liten stund slik at celleaggregater synker til bunnen av røret.
- 16) Den klare delen av suspensjonen tas så over i et nytt rør (50 mL) med 15 mL løsning 5 (tabell 2.3).
- 17) Trinn 15 og 16 gjentas til det ikke lenger er celleaggregater i suspensjonen. Løsningene samles i røret som inneholder løsning 5.
- 18) Røret sentrifugeres på 900 rpm i 7 minutter.
- 19) Supernatanten fjernes og pelleten fortynnes i egnet medium (tabell 2.4 og tabell 2.6). Deretter telles cellene og fordeles i skåler (se 2.3.3).

Tabell 2.1: Oversikt over utstyr brukt under preparering av korncellekulturer

Autoklaveres for preparering

1 saks og 1 pinsett, buet.
 2 pinsetter, rette. Brukes til fjerning av hjernehinne.
 Trypsineringsflaske
 4 stk 100 mL glassflasker (med kork).
 1 stk 500 mL glassflaske (med kork).
 4 plastreagensrør (50 mL).
 500 mL målesylinder
 Pasteurpipetter (glass)
 Erlenmeyerkolbe

Sterilt utstyr

Pipetter
 Skalpeller
 Petriskåler

Annet utstyr

Gassbrenner
 Sentrifuge
 Vannbad 37 °C

Tabell 2.2: 10X Krebs-Ringerløsning

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
NaCl	1,21 M	35,35 g
KCl	48 mM	1,80 g
KH ₂ PO ₄	12 mM	0,83 g
NaHCO ₃	0,25 M	10,70 g
Glukose	0,14 M	12,85 g
Fenolrød	0,3 mM	50 mg
Destillert vann		Ad 500 mL
Løsningen sterilfiltreres gjennom et 0,22 µm sterilfilter og over i autoklaverte flasker som oppbevares i kjøleskap. Holdbarheten er 5-6 måneder.		

Man trenger fem løsninger til preparering av cellekulturer og disse lages ferske rett før prepareringen begynner. Løsningene blandes i erlenmeyerkolber og sterilfiltreres 0,22 µm over i autoklaverte flasker.

Tabell 2.3: Løsning 1-5

Løsning 1	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
BSA (bovint serumalbumin)	1,5 g
10X Krebs-Ringerløsning	50 mL
MgSO ₄ (38,2 mg/ml)	4,0 mL
Destillert vann	Ad 500 mL

Løsning 2	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Trypsin	25 mg
Løsning 1	100 mL

Løsning 3	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Deoxyribonuklease 1 (DNase 1)	6, 25 mg
Trypsininhibitor	26,0 mg
MgSO ₄ (38,2 mg/ml)	0,5 mL
Løsning 1	Ad 50 mL

Løsning 4	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Løsning 3	16 mL
Løsning 1	100 mL

Løsning 5	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
MgSO ₄ (38,2 mg/ml)	320 µL
CaCl ₂ (12 mg/ml)	320 µL
Løsning 1	40 mL

Mengden av løsningene er beregnet til 80 hjerner.

Tabell 2.4: Platemedium til utplating av kyllingkornceller

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Basal Medium Eagle (BME)		500 mL
Hesteserum, varmeinaktivert	10 %	50 mL
Glutamin	2 mM	146 mg
KCl	22 mM	825 mg
Insulin	100 nM	50 µL fra 1 mM stock-løsning
Penicillin, streptomycin	1 %	5 mL

Tabell 2.5: Serumfritt CGC-medium til rottekornceller

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Basal Medium Eagle (BME)		500 mL
Glutamin	2 mM	146 mg
KCl	22 mM (*25 mM)	825 mg
Penicillin, streptomycin	1 %	5 mL
Komponentene løses i litt av mediet og sterilfiltreres.		

Tabell 2.6: Vanlig CGC-medium til rottekornceller

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Serumfritt CGC-medium		500 mL
Føtalt kalveserum, varmeinaktivert	10 %	50 mL

Mediene oppbevares i kjøleskap.

2.3.3 Utplating av cellekulturene

Prosedyre for utplating:

- 1) Pelleten løses i 10 mL egnet medium (tabell 2.4 og tabell 2.6). Deretter overføres den til en steril mediumflaske med samme medium.
- 2) Cellesuspensjonen blandes godt og litt av suspensjonen overføres til et tellekammer og celletettheten bestemmes ved å telle to 4×4 områder. Gjennomsnittstallet benyttes.
- 3) Etter celledelling plates cellene ut på skåler med følgende tetthet:
 - Kyllingkornceller: $1,7 \times 10^6$ celler/mL.
 - Rottekornceller: $1,2 \times 10^6$ celler/mL.
- 4) Mengde platemedium beregnes ved hjelp av formelen:

$$\frac{\text{Antall mL cellesuspensjon} \times \text{celletetthet per mL i cellesuspensjonen}}{\text{Ønsket celletetthet per mL}}$$
- 5) Mengde cellesuspensjon som tilsettes skålene:
 - Små skåler (d= 4,0 cm): 1 mL cellesuspensjon.
 - Medium skåler (d= 6,0 cm): 3,3 mL cellesuspensjon.
 - Store skåler (d= 9,2 cm): 10 mL cellesuspensjon.
- 6) Skålene settes til inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.3.4 Bytte av medium og tilsetning av Ara-C

24 timer etter at korncellene er preparert tilsettes det Ara-C (Cytosin β -D-Arabino-Furanoside) til de skålene som skal ha det. Ara-C, som er et cytostatikum, tilsettes enten samtidig eller etter at mediet er byttet for å hindre vekst av ikke-nevronale celler.

Prosedyre for bytting av platemedium til næringsmedium for kyllingkornceller:

- 1) Gammelt medium pipetteres av.
- 2) Det tilsettes nytt næringsmedium til skålene (tabell 2.7).
 - Små skåler (d= 4,0 cm) tilsettes 1 mL nytt medium.
 - Mediumskåler (d= 6,0 cm) tilsettes 3,3 mL nytt medium.
 - Store skåler (d= 9,2 cm) tilsettes 10 mL nytt medium.
- 3) For at ikke skålene skal tørke ut og cellene dø gjøres punkt 1-2 for én til to skåler av gangen.
- 4) Skålene settes til inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO₂.

Prosedyre for tilsetning av Ara-C til korncellekulturer:

- 1) 1 mg Ara-C løses i 10 mL serumfritt medium.
- 2) Løsningen sterilfiltreres gjennom et 0,22 μ m sterilfilter til et sterilt rør. Arbeidet foregår i LAF-benk.
- 3) Sluttkonsentrasjonen i hver skål skal være 10 μ M Ara-C. Mengdene som tilsettes blir som følger:
 - Små skåler (d= 4,0 cm) tilsettes 25 μ L 0,1 mg/mL Ara-C.
 - Mediumskåler (d= 6,0 cm) tilsettes 83 μ L 0,1 mg/mL Ara-C.
 - Store skåler (d= 9,2 cm) tilsettes 250 μ L 0,1 mg/mL Ara-C.
- 4) Skålene settes til inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO₂.

Tabell 2.7: Definert næringsmedium til kyllingkornceller

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Basal Medium Eagle (BME)		500 mL
Glutamin	2 mM	146 mg
KCl	22 mM	825 mg
Humant transferrin	100 µg/mL	50 mg
Putrescin	60 µM	4,8 mg
Natriumselenitt	30 nM	150 µL fra 100 µM stock-løsning
Trijodtyronin (T ₃)	1 nM	17 µL fra 20 µg/mL stock-løsning
Insulin	25 µg/mL	12,5 mg
Penicillin, streptomycin	1 %	5 mL

2.4 Glutamateksponering av rottekornceller

For å oppnå celledød i nevronkulturene eksponeres korncellene for glutamat og glysin samt en eksponeringsbuffer. Én ubehandlet skål brukes som kontroll. I denne oppgaven er det rottekornceller som har blitt eksponert.

Prosedyre for eksponering:

- 1) Mediet pipetteres av skålene som skal eksponeres.
- 2) Skålene vaskes med eksponeringsløsning (tabell 2.12). Skålen vipres forsiktig og løsningen pipetteres deretter av.
 - Mediumskåler vaskes med 1 mL.
 - Store skåler vaskes med 2 mL.
- 3) Eksponeringsløsning tilsettes. Det tilsettes:
 - 2 mL til en mediumskål.
 - 5 mL til en stor skål.
- 4) Skålene inkuberes i 15 minutter ved romtemperatur.
- 5) Eksponeringsløsningen pipetteres av.
- 6) Alle skålene vaskes med serumfritt medium (tabell 2.5). Beregn 1 mL til en mediumskål og 2 mL til en stor skål. Skålen vipres forsiktig og mediet pipetteres av.

- 7) Skålene tilsettes deretter serumfritt medium og settes til inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO₂.
- a) Mediumskåler som skal brukes til celletelling (se 2.5): 24 timer.
 - b) Mediumskåler som skal mikroskoperes (se 2.8): opptil 2 timer.
 - c) Store skåler som skal høstes til videre analyse (se 2.9): opptil 2 timer.

Tabell 2.8: Lockes bufferløsning uten Mg²⁺

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
NaCl	154 mM	9,00 g
CaCl ₂	2,3 mM	0,34 g
KCl	5,6 mM	0,42 g
Glukose	5,6 mM	1,00 g
NaHCO ₃	3,6 mM	0,30 g
Hepes	5 mM	1,19 g
MQ-vann		Ad 1000 mL
pH justeres til 7,4.		

Tabell 2.9: Lockes bufferløsning med Mg²⁺

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
MgCl ₂ x 7H ₂ O	1,2 mM	0,12 g
Lockes bufferløsning uten Mg ²⁺		Ad 500 mL

Løsningene oppbevares i kjøleskap.

Det lages stockløsninger av glutamat og glysin som brukes ved tillaging av eksponeringsløsningene. Løsningene må bære nylagde og holde romtemperatur ved bruk.

Tabell 2.10: 10 mM glutamat stockløsning

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Glutamat	10 mM	67,6 mg
Destillert vann		40 mL
Allikvoteres i 1 mL eppendorfrør og lagres ved – 20 °C.		

Tabell 2.11: 1 mM glysin stockløsning

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Glysin	1 mM	3 mg
Destillert vann		40 mL
Allikvoterer i 1 mL eppendorfrør og lagres ved – 20 °C.		

Tabell 2.12: Eksponeringsløsninger

Bufferbehandling	Lockes bufferløsning med Mg ²⁺
Glutamatbehandling	
100 µM glutamat	400 µL 10mM glutamat stockløsning
10 µM glysin	400 µL 1 mM glysin stockløsning
	39,2 mL Lockes bufferløsning uten Mg ²⁺

2.5 Deteksjon av celledød

Celledød detekteres 24 timer etter eksponering ved hjelp av farging med trypanblå. Trypanblå tas kun opp i døde celler fordi membranen til døde celler ikke er intakt. Når fargingen er gjort kan mikroskopering og celletelling utføres.

Prosedyre for celledødsdeteksjon:

- 1) Celletelling utføres på mediumskåler. Skålene volum justeres til 1 mL.
- 2) 250 µL 1 % trypanblå tilsettes i hver skål (tabell 2.15).
- 3) Skålene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 30 minutter.
- 4) Skålene tas ut av inkubatorskapet og fargeløsningen helles av i et eget rør som senere kastes i risikoavfallet. Skålene telles én og én i mikroskopet. Det telles levende og døde celler på fire like store områder. Det bør ikke telles for mange skåler av gangen.

Prosentvis celledød = $\frac{\text{Antall fargede celler} \times 100 \%}{\text{Totalt antall celler}}$

Totalt antall celler

Tabell 2.13: 2 % trypanblå-stockløsning

<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Trypanblå	2 g
Destillert vann	100 mL
Løsningen varmes til kokepunkt under omrøring med magnetrører og avkjøles deretter ved romtemperatur. Når løsningen er avkjølt, filtreres den over på flaske og oppbevares i romtemperatur.	

Tabell 2.14: 1,8 % NaCl-stockløsning

<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
NaCl	1,8 g
Destillert vann	100 mL
Oppbevares i romtemperatur.	

Tabell 2.15: 1 % trypanblå i 0,9 % NaCl-løsning

<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
2 % trypanblå-stockløsning	125 μ L \times antall skåler
1,8 % NaCl-stockløsning	125 μ L \times antall skåler
Komponentene blandes i et rør rett før tilsetning i skåler.	

2.6 Splitting av PC12-celler

PC12-cellene splittes hver tredje til fjerde dag når de er konfluente. De inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂. Arbeidet utføres i LAF-benk.

2.6.1 Splitting til flaske

Prosedyre for splitting av PC12-celler til flaske:

- 1) Gammelt medium tømmes av.
- 2) 10 mL nytt PC12-medium tilsettes (tabell 2.16). Det bankes på sidene av flasken slik at cellene løsner fra bunnen. Det kontrolleres i mikroskop at cellene har løsnet.
- 3) Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned ca 10 ganger for å få en jevn fordeling av cellene og for å løse opp aggregater. Det kontrolleres i mikroskop at aggregatene er

løst. Hvis nødvendig kan en pasteurpipette brennes av og brukes til å pipettere opp og ned flere ganger.

- 4) 1,5 mL cellesuspensjon tilsettes en ny cellekulturflaske. Deretter tilsettes flasken 20 mL nytt PC12-medium. Den beveges forsiktig så det blir en jevn fordeling av cellene. Flasken settes til inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO₂.

2.6.2 Splitting til skåler

Prosedyre for splitting av PC12-celler til skåler:

- 1) Prosedyren for splitting av PC12-celler til flaske (se 2.6.1) følges til og med punkt 3.
- 2) Litt av cellesuspensjonen overføres til et tellekammer og celletettheten bestemmes ved å telle to 4 × 4 områder. Gjennomsnittstallet benyttes.
- 3) Ønsket celletetthet er 7×10^4 celler/mL. Mengde nødvendig cellesuspensjon beregnes ut i fra formelen:

$$\text{Antall mL} = \frac{\text{Antall mL per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{tetthet pr ml } (7 \times 10^4)}{\text{Antall celler i tellekammer} \times 10^4}$$

- 4) Volumet cellesuspensjon som er beregnet tilsettes en steril erlenmeyerkolbe. Nytt PC12-medium tilsettes kolben. Hvor mye PC12-medium som er nødvendig beregnes ut i fra formelen:
$$\text{Antall mL} = (\text{Antall mL per skål} \times \text{antall skåler}) - \text{antall mL cellesuspensjon}.$$
- 5) PC12-mediet og cellesuspensjonen blandes godt før det overføres til sterile skåler og inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂.
 - Små skåler tilsettes 1 mL (brukes ikke i denne oppgaven).
 - Mediumskåler tilsettes 3,3 mL.
 - Store skåler tilsettes 10 mL.

Tabell 2.16: PC12-medium

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)		500 mL
Føtalt kalveserum	10 %	50 mL
Hesteserum	5 %	25 mL
Natriumpyruvat	1 %	5 mL
Penicillin, streptomycin	1 %	5 mL

2.7 Fluorescensmerking av organeller

Det brukes korncellekulturer fra kylling og rotte samt PC12-celler til forsøkene.

Korncellene fra kylling brukes på dag 3 etter preparering mens korncellene fra rotte brukes på dag 7 etter preparering. PC12-cellene kan brukes dagen etter splitting.

2.7.1 Tillaging av fargereagenser

Som fargereagenser brukes MitoTracker® Green FM og Red CM-H₂XROS, ER-tracker™ Blue-White DPX og Hoechst. Alle fargereagensene lokaliseres til forskjellige organeller i cellene. MitoTracker lokaliserer til mitokondrier, ER-tracker til endoplasmatisk retikulum (ER) og Hoechst til kjernene. Det vil bli avgitt fluorescens og den kan leses av i en plateleser.

ER-Tracker (1 mM) kommer ferdig løst fra produsenten og kan brukes direkte. De andre løsningene lages på forhånd.

Tabell 2.17: MitoTracker®-løsninger

MitoTracker® Green FM 1 mM stock-løsning	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
1 MitoTracker ampulle	50 µg
DMSO	74 µL
Oppbevares ved – 20 °C.	

MitoTracker® Green FM 100 µM stock-løsning	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
1 MitoTracker ampulle	50 µg
DMSO	745 µL
Oppbevares ved – 20 °C.	

MitoTracker® Red CM-H₂XROS 100 µM	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
1 MitoTracker ampulle	50 µg
DMSO	1000 µl
Løsningen oksideres og må lages rett før bruk.	

Tabell 2.18: Hoechst 1 mg/mL

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Hoechst 33342	1 mg/mL	10 mg
MQ-vann		10 mL
Allikvoterer 1 mL og oppbevares i kjøleskap.		

2.7.2 Tilsetning av fargereagenser til celler

Prosedyre for tilsetning av fargereagens til cellene:

- 1) Fargereagensløsningene må være romtempererte når de tilsettes og bør tas ut 20 minutter før de skal brukes.
- 2) Skålene med celler overføres fra inkubatoren til LAF-benken. Volumet på mediet justeres til 2 mL for mediumskåler og 5 mL for store skåler.
- 3) Fargereagensene tilsettes direkte i skålene:
 - a) MitoTracker® Green FM 1 mM (tabell 2.17): 0,5 µL til stor skål. Rottekornceller tilsettes 100 µM og 5 µL fordi dette har tidligere vist seg å fungere godt.

- b) MitoTracker® Red CM-H₂XROS 100 µM (tabell 2.17): Denne gir ofte svakere signaler og kan tilsettes i høyere konsentrasjon. 5-10 µL tilsettes til stor skål.
- c) Hoechst 1 mg/mL (tabell 2.18): 1-2 µL tilsettes stor skål.
- d) ER-Tracker 1 mM: Fordi ER-Tracker farger dårligere enn MT Green og Hoechst tilsettes det 5 µL til en stor skål.

Skal skålene farges med flere ulike reagenser kan ikke Hoechst og ER-Tracker tilsettes i samme skål fordi disse avleses på samme bølgelengde.

- 4) Skålene vippes fram og tilbake slik at fargereagensene blandes godt før de settes tilbake i inkubatoren ved 37 °C og 5 % CO₂ i minimum 20 min. Dersom skålene er tilsatt MitoTracker® Red CM-H₂XROS må det beregnes 45 min - 1 time.
- 5) Fargen sjekkes i mikroskopet (se 2.8). Dersom fargingen ikke er tilfredsstillende kan skålene settes tilbake i inkubatoren.

2.8 Mikroskopering ved bruk av fluorescensmikroskop

For å studere fargingen og fordeling av fargene brukes fluorescensmikroskop. Objektivene som brukes er 20X og 40X.

Prosedyre for mikroskopering:

- 1) Fluorescenslampen skrus på 30 minutter før mikroskopering for å oppnå et stabilt lys.
- 2) Det benyttes 20X og 40X objektiver.
 - MitoTracker® Green: Eksitasjon 490 nm og emisjon 516 nm.
 - MitoTracker® Red CM-H₂XROS: Eksitasjon 579 nm og emisjon 599 nm.
 - Hoechst (33342): Eksitasjon 350 nm og emisjon 461 nm.
 - ER-Tracker™: Eksitasjon 374 nm og emisjon 430-640 nm.
- 3) Det tas bilder.

2.9 Høsting og separering ved sentrifugering

Til høsting benyttes normalt store skåler. Eventuelt kan tre mediumskåler slås sammen ved behov.

2.9.1 Høsting

Prosedyre for høsting:

- 1) Skålene vaskes to ganger med 1 mL PBS som står på is (tabell 2.19).
- 2) PBS pipetteres av slik at all løsningen er fjernet.
- 3) 200 μ L høstebuffer med ATP tilsettes skålen (tabell 2.22). Dersom det benyttes flere mediumskåler i stedet for store skåler kan man tilsette 200 μ L i den ene, skrape og overføre dette til den neste skålen.
- 4) Cellene skrapes av med en cellehøster. Det skrapes i to retninger vinkelrett på hverandre.
- 5) Cellesuspensjonen som dannes i trinn 4 pipetteres av og overføres til et eppendorfrør som står på is.
- 6) Cellesuspensjonen homogeniseres ved hjelp av en sprøyte (1 mL) og en kanyle (25 G). Løsningen trekkes opp og ned 50 ganger for at cellene skal bli tilstrekkelig knust. Dersom det skal høstes hele celler homogeniseres ikke prøven.
- 7) Rensetrinn en: Cellesuspensjonen sentrifugeres ned ved maksimal sentrifugehastighet (10000g) i 10 minutter.
- 8) Supernatanten pipetteres av og overføres til et nytt eppendorfrør som kalles S1. Senere brukes supernatantene fra rensetrinnene til å kontrollere tap av cellekomponenter.
- 9) Cellepelletten resuspenderes i 200 μ L separasjonsbuffer med ATP (tabell 2.24).
- 10) Rensetrinn to: suspensjonen sentrifugeres ned ved 10000g i 10 minutter.
- 11) Supernatanten pipetteres av og overføres til et nytt eppendorfrør som kalles S2.
- 12) Cellepelletten resuspenderes i 200 μ L separasjonsbuffer med ATP.
- 13) Mitokondriene kan nå separeres. Rensete prøver med hele celler kan nå fryses ned ved -70 °C eller de kan brukes i videre forskning.

Tabell 2.19: Fosfatbufret saltvann (PBS)

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
NaCl	137 mM	8,0 g
KCl	2,7 mM	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,27 g
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	6,5 mM	1,44 g
MQ-vann		Ad 1000 mL
pH justeres til 7,4 med HCl. Autoklaveres		

Tabell 2.20: Hepes-KOH

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Hepes	0,5 M	23,83 g
Løses i MQ-vann		100 ml
1 M KOH tilsettes til pH 7,4		
MQ-vann		Ad 200 mL

Tabell 2.21: Høstebuffer uten ATP

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Mannitol	210 mM	7,65 g
Sukrose	70 mM	4,79 g
BSA, fettfri	0,1 %	200 mg
EGTA	1 mM	76 mg
0,5 M EDTA-løsning	1 mM	400 µl
0,5 M Hepes-KOH	10 mM	4 ml
MQ-vann		Ad 200 ml
pH 7,4 kontrolleres. Sterilfiltreres i LAF-benk og oppbevares i kjøleskap. For å unngå vekst bør høstebufferen sterilfiltres hver 2.uke. ATP tilsettes rett før bruk på grunn av begrenset stabilitet.		

Tabell 2.22: Høstebuffer med ATP

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
ATP	1 mM	5,5 mg
Høstebuffer uten ATP		10 mL
Løsningen sterilfiltreres før bruk.		

Tabell 2.23: Separasjonsbuffer uten ATP

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Mannitol	210 mM	7,65 g
Sukrose	70 mM	4,79 g
0,5 M HEPES-KOH pH 7,4	10 mM	4 ml
MQ-vann		Ad 200 mL
pH 7,4 kontrolleres. Sterilfiltreres i LAF-benk. Oppbevares i kjøleskap. For å unngå vekst bør separasjonsbufferen sterilfjernes hver 2.uke. ATP tilsettes rett før bruk på grunn av begrenset stabilitet.		

Tabell 2.24: Separasjonsbuffer med ATP

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
ATP	1 mM	11 mg
Separasjonsbuffer uten ATP		20 mL
Løsningen sterilfiltreres før bruk.		

2.9.2 Opparbeidelse av organellefraksjoner ved sentrifugering

Prosedyre for opparbeidelse av organellefraksjoner:

- 1) Cellesupensjonen fra punktet (se 2.9.2 punkt 13) over sentrifugeres ved 250g i 7 minutter. Supernatanten overføres til nytt eppendorfrør. Pelleten resuspenderes i 200 µL separasjonsbuffer med ATP og settes på is. Prøven kalles P-250.
- 2) Supernatanten fra trinn 1 sentrifugeres ved 500g i 7 minutter. Supernatanten overføres til nytt eppendorfrør. Pelleten resuspenderes i 200 µL separasjonsbuffer med ATP og settes på is. Prøven kalles P-500.
- 3) Samme prosedyre som over gjentas på 750g i 7 minutter, 3000g i 10 minutter, 6000g i 10 minutter og 10000g i 10 minutter. Prøvene kalles henholdsvis P-750, P-3000, P-6000 og P-10000. Den siste supernatanten spares og kalles S-10000.

Hvis nødvendig kan P-6000 og P-10000 slås sammen ved at man ikke sentrifugerer på 6000g.

- 4) Prøvene kan brukes videre eller fryses ned ved -70 °C. Det er nå mulig å lese av fluorescensen med plateleser.

2.9.3 Måling av fluorescens i plateleser

Når cellene er farget opp leses fluorescensen av i en plateleser. Filtere med bølgelengder i nærheten av eksitasjons- og emisjonsmaksimum benyttes. Fargereagensene har en begrenset stabilitet og avlesningen bør skje rett etter separering.

Prosedyre for måling av fluorescens:

- 1) 100 µl av hver prøve appliseres i brønner på en hvit 96-brønns plate. Bunnen av brønnene må være dekket. Bobler kan fjernes ved hjelp av en 25G kanyle.
- 2) Prøvene avleses i plateleser:
 - a) Avlesning MitoTracker® Green: eksitasjonsfilter 485 nm/ emisjonsfilter 535 nm.
 - b) Avlesning MitoTracker® Red CM-H₂XROS: eksitasjonsfilter 590 nm/emisjonsfilter 635 nm.
- 3) Avlesning Hoechst/ER-Tracker™: eksitasjonsfilter 360 nm/emisjonsfilter 465 nm. Prøvene kan pipetteres tilbake til eppendorfrørene for å brukes i senere forsøk. De fryses ved -70 °C.

2.10 Glukosedeprivering av PC12-celler

Glukosedeprivering brukes som en celledødsmodell i PC12-celler.

Prosedyre for glukosedeprivering:

- 1) Store skåler og mediumskåler splittes i vanlig PC12-medium (tabell 2.16). Cellene inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer. Halvparten av skålene er kontrollskåler og skal ikke behandles. Mediumskåler brukes til celledøds telling og deteksjon av celledød (se 2.5).
- 2) Mediet helles av og skålene vaskes tre ganger med 1,5 mL glukosefritt medium (tabell 2.25). Rester i kanten av skålen pipetteres av.
- 3) Skålene tilsettes 10 mL glukosefritt medium og settes til inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4 timer eller 24 timer.

- 4) Ca 45 minutter før full inkubasjonstid (4 t eller 24 t) volumjusteres alle skålene, både kontrollskåler og glukosedepriverte skåler, til 5 mL. De tilsettes:
 - 1 mM MT Green (0,5 µL) + 1mM MT Red (5 µL) + Hoechst (1 µL) eller
 - 1 mM MT Green (0,5 µL) + 1mM MT Red (5 µL) + 1mM ER-Tracker (5µL)
- 5) Fargen sjekkes i mikroskopet.
- 6) Cellene er nå klare til å bli høstet og separert (se 2.9).
- 7) Mediumskåler som skal telles følger prosedyre for deteksjon av celledød (se 2.5).
Skålene står i 24 timer fra mediet er byttet til de telles.

Tabell 2.25: Glukosefritt PC12-medium

<i>Komponent</i>	<i>Sluttkonsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) No Glucose 1X		500 mL
Føtalt kalveserum	1 %	5 mL
Hesteserum	1 %	5 mL
Natriumpyruvat	1 %	5 mL
Penicillin, streptomycin	1 %	5 mL

2.11 MTT-assay

I forbindelse med glukosedepriivering måles mitokondrieaktiviteten i cellene for å få et mål på vitalitet. MTT-assayet måler aktiviteten til enzymer som reduserer MTT til lilla formazan i levende celler ved å kvantifisere absorbansen av fargereaksjonen som oppstår. Absorbansen måles på 570 nm. Det er kun levende celler som detekteres (Mosmann 1983; Aras, Hartnett et al. 2008).

Prosedyre for MTT-assay:

- 1) PC12-celler splittes i et blankt og sterilt 96-brønnsplate. Platen settes til inkubasjon ved 37 °C og 5 % CO₂ over natt.
- 2) Cellene behandles. Halvparten av brønnene skal være ubehandlet mens den resterende halvparten glukosedepriiveres. Mediet fjernes og halvparten av brønnene vaskes tre ganger ved at det tilsettes 200 µL glukosefritt medium (tabell 2.25) i hver brønn.
- 3) Det settes så på 90 µL medium (med eller uten glukose).

- 4) 10 µL MTT-løsning (tabell 2.26) tilsettes i hver brønn og platen inkuberes ved 37 °C og 5 % CO₂ i 1,5-2,5 timer. Tiden er avhengig av fargereaksjonen. Ved høy celletetthet går reaksjonen raskere til metning og inkubasjonstiden vil være kortere.
- 5) Etter at mediet er fjernet, løses cellene og fargekrystallene ved å tilsette 100 µL DMSO. Platen inkuberes i ytterligere 30 min slik at krystallene løses og absorbansen kan måles.
- 6) Absorbans måles i plateleser på 570 nm.
- 7) Utregningen foretas ved at de 8 høyeste og 8 laveste verdiene strykes for å korrigere for avvik i celletettheten.

Tabell 2.26: MTT-løsning 5 mg/mL

<i>Komponent</i>	<i>Konsentrasjon</i>	<i>Mengde</i>
Modified 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)	0,5 %	50 mg
DMEM (gjærne serumfritt for å redusere risiko for at stoffet skal binde seg til det)		10 mL
Blandes i avtrekkskap. Etter at løsningen er blandet sentrifugeres den lett slik at tørrstoff som ikke er helt løst danner en pellet. Løsningen tas over i et nytt rør, pellet kastes i risikoavfall. Allikvoterer 1 mL og fryses.		

2.12 Westernanalyse

2.12.1 Klargjøring og proteinmåling av prøvene

Fordi det er lite protein i prøvene må de oppkonsentreres før proteinmålingen. Til å måle protein brukes BCA Protein Assay Kit fra Pierce®. Kitet gir en reduksjon av Cu²⁺ til Cu¹⁺ i alkalisk miljø og reagensene vil endre farge som en funksjon av proteinmengden.

Absorbansendringer kan leses av i en plateleser og proteinmengden kan regnes ut.

Prosedyre for oppkonsentrering, klargjøring og proteinmåling:

- 1) Prøvene det skal måles protein på tines dersom de har vært frosset.
- 2) Prøvene sentrifugeres på 10000g i 5 min.

- 3) Supernatanten fjernes og pellet resuspenderes i 50 µL separasjonsbuffer. Prøvene er nå oppkonsentrert og det kan måles protein
- 4) Working reagent blandes og tilsettes i alle brønner der det skal gjøres målinger (tabell 2.27). Det bør beregnes 14 brønner til utarbeidelse av standardkurven og tre brønner per prøve som skal måles. Det brukes en blank 96-brønnsplate.
- 5) I de 14 første brønnene tilsettes samme separasjonsbuffer som ble brukt under cellehøstingen for å korrigere for bakgrunnsstøy. Disse 14 brønnene brukes til standardkurveutarbeidelse. Volumet av bufferen er like stort som volumet av prøvene som måles.
- 6) BSA 2 mg/mL blandes med PBS og settes på i økende mengde (tabell 2.27). Det settes på to paralleller av hver. Volumene som brukes er 0 µL, 1 µL, 2,5 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL og 40 µL (tabell 2.29).
- 7) Platen inkuberes i minst 1 time ved 37 °C.
- 8) Absorbans leses av i plateleser ved 570 nm på programmet nevro protein.
Proteinmengden beregnes ut i fra standardkurven.
- 9) Prøvene tilsettes så laemmli-buffer (tabell 2.28). Fordi proteinkonsentrasjonen er lav brukes 4X laemmli-buffer (forholdet 3:1 av protein og buffer).

Tabell 2.27: Løsninger til proteinmåling

WR (Working reagent)	
BCA Reagent A	50 deler
BCA Reagent B	1 del

Proteinløsning til standardkurve (BSA 0,5 mg/ml)	
BSA 2 mg/ml fra BCA kit	50 µL
PBS	150 µL

Tabell 2.28: 4X Laemmli-buffer

<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
4M Tris-HCl pH 6,8	0,75 mL
20 % SDS	4 mL
85 % glyserol	2,35 mL
MQ-vann	0,9 mL
2-merkaptoetanol	2 mL
Bromfenolblått	Noen korn
Merkaptoetanol og bromfenolblått tilsettes i avtrekkskap.	
Merkaptoetanol tilsettes rett før bruk.	

Tabell 2.29: Oppsett proteinmåling

0 µL	10 µL	Prøve 1									
0 µL	10 µL	Prøve 2									
1 µL	20 µL	Prøve 2									
1 µL	20 µL	Prøve 2									
2,5 µL	40 µL	Prøve 3									
2,5 µL	40 µL	Prøve 3									
5 µL	Prøve 1	Prøve 3									
5 µL	Prøve 1	Osv...									

2.12.2 Støping av gel

Westerngeler kan støpes med forskjellig prosent og hvilken prosent man velger vil være avhengig av proteinene man ønsker å detektere. Dersom det er små proteiner som skal detekteres, velges gjerne en høyere tetthet på gelen fordi det vil gi mer motstand for proteinene når de vandrer gjennom, og de små proteinene vil også separeres godt. Hvor tykk gelen (0,75 mm eller 1,5 mm) skal være velges ut i fra volumet man ønsker å påføre i brønnene. Har man lite protein i prøvene vil det være gunstig å brukes et større volum enn om man har mye protein. I denne oppgaven brukes 10 % gel, 1,5 mm tykkelse og 10 brønner. Volumet i hver brønn er 50 µl.

Prosedyre for gelstøping:

- 1) De to glassplatene, bakplate og forplate, vaskes og settes sammen kant i kant.
- 2) Platene festes i støpeformen og det kontrolleres at det ikke er lekkasje ved å helle vann mellom glassplatene. Dersom det ikke er noen lekkasje helles vannet ut. Man kan bruke litt cellopapir for å fjerne vannrester som sitter i kantene.

- 3) Komponentene i nedre gel blandes i et sterilt plastrør (tabell 2.30). Temed tilsettes til slutt fordi det induserer geldannelse. Blandingen helles mellom glassplatene. Gelstøpingen gjøres i avtrekksskap fordi det brukes akrylamid som er giftig.
- 4) Litt MQ-vann helles i mellom glassplatene for at gelen skal få en rett kant og for at eventuelle luftbobler i gelen skal forsvinne. Eventuelt kan man bruke en sprøyte og kanyle for å sprekke boblene på toppen av gelen i stedet for å helle på vann.
- 5) Gelen skal så polymerisere i 30 min.
- 6) Komponentene i øvre gel blandes i et sterilt plastrør (tabell 2.30). Temed tilsettes til slutt.
- 7) Dersom det er MQ-vann over den nå stivnede gelen helles det av og den øvre gelen helles over.
- 8) En plastkam, som lager brønner i gelen, skyves forsiktig ned i åpningen mellom glassplatene. Geloppsatsen snus innover i avtrekket når man setter i kammen for å unngå sprut.
- 9) Gelen polymeriserer i ytterligere 30 min.

Tabell 2.30: Løsninger til gelstøping

Nedre gel-buffer (pH 8,8)	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Trizma base	18,17 g
20 % SDS	2,0 mL
MQ-vann	Ad 100 mL
pH justeres til 8,8 med HCl.	

Øvre gel-buffer (pH 6,8)	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Trizma base	6,06 g
20 % SDS	2,0 mL
MQ-vann	Ad 100 mL
pH justeres til 6,8 med HCl.	

Nedre gel 10 % og 1,5 mm	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
MQ-vann	3 mL
Nedre gelbuffer	1,8 mL
Akrylamid	2,4 mL
10 % APS	36 µL
TEMED	3,6 µL

Øvre gel (stacking gel)	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
MQ-vann	2,4 mL
Øvre gel-buffer	1,0 mL
Akrylamid	0,6 mL
10 % APS	20 µL
TEMED	4 µL

2.12.3 Elektroforese

Under elektroforesen vil proteinene separeres avhengig av størrelsen. Ladningen på proteinene er lik og skal ikke ha betydning for separeringen. Gjennom den øvre gelen samler proteinene seg slik at de danner et smalt bånd for å bli godt separert når de kommer til den nedre gelen.

Prosedyre for elektroforese:

- 1) Når den øvre gelen har stivnet tas glassplatene ut og skylles. Plastkammen fjernes forsiktig.
- 2) Karet for gelkjøring settes sammen.
- 3) Elfobuffer helles i karet (tabell 2.31). Pass på å fylle opp karet.
- 4) Luftbobler som dannes under glassplatene kan fjernes ved hjelp av en kanyle som er bøyd.
- 5) En gul plastkam settes så over gelen for å angi brønnene.
- 6) Den første brønnen tilsettes 5 µL standard. Prøvene tilsettes i de gjenværende brønnene. Det benyttes store brønner og det tilsettes 50 µL i hver brønn.

Pipettespissen føres ned til man kjenner at den stopper i platen, så slippes prøven forsiktig ut.

- 7) Strøm kobles på 90 V i 15 min, deretter 150 V til prøvene har vandret gjennom gelen (ca 1 time). Pass på at det begynner å bruse når strømmen settes på. Dersom det ikke bruser, sjekk om det er nok elfobuffer. Ønsker man å detektere proteiner som er små er det viktig at prøvene ikke går for langt.

Tabell 2.31: Elfobuffer

<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Trizma base	3,03 g
Glysin	14,14 g
20 % SDS	5 mL
Destillert vann	Ad 1000 mL

2.12.4 Blotting av gel over på membran

Under blottingen overføres proteinene og standarden til en membran. Når blottingen er gjennomført farger man membranen med en fargeløsning for å se om proteinene er jevnt overført.

Prosedyre for blotting av gel:

- 1) Det beregnes to filter per gel. To skrubber legges sammen med to filterpapir og en membran i et kar med blottebuffer (tabell 2.32). Alt dette gjøres i avtrekkskap. Bruk nitrilhansker fordi det er metanol i blottebufferen.
- 2) Gelen tas forsiktig ut av oppsatsen og platene skylles i vann. Platene brykkes fra hverandre ved hjelp av en plastspatel som forsiktig føres mellom platene og litt over den øvre gelen slik at det kommer luft inn.
- 3) Den øvre gelen skjæres av og fjernes. Det legges et filterpapir over gelen.
- 4) Gelen løsnes fra den tynne glassplaten den ligger på med en plastspatel og det legges en membran på den andre siden.
- 5) Det hele legges sammen i denne rekkefølgen:
 - Svart plastramme
 - Skrubber
 - Filterpapir

- Gel
- Membran
- Filterpapir
- Skrubbb
- Hvit plastramme

Rull med en pipettespiss på membranen og filteret som legges over for å presse ut eventuell luft mellom lagene. Luft mellom gel og membran vil gi dårlig blotting.

- 6) Rammen og gelen overføres til et blottekar. En magnetrører og en iskassett settes i karet og oppsatsen fylles opp med blottebuffer før den settes på kjølerommet.
- 7) Strømstyrken settes til 400 mA i 1 time og 30 minutter eller 50 mA over natt.
- 8) Det fylles et lite kar med Ponceau S løsning og to store kar med destillert vann. Membranen legges i karet med Ponceau S løsning i omtrent 1 minutt med proteinsiden opp slik at proteinene farges. Deretter skylles den i det første karet med vann, så det andre.
- 9) Membranen klippes til og legges i plastlomme for kopi.

Tabell 2.32: Blottebuffer

<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Trizma base	3,03 g
Glysin	14,14 g
Metanol	200 mL
Destillert vann	Ad 1000 mL

2.12.5 Blokking og tilsetning av antistoff

Prosedyre for blokking og antistoffpåsetning:

- 1) Membranen legges ved hjelp av pinsett i et 50 mL plastrør med proteinsiden mot midten.
- 2) Det blokkes ved at det tilsettes 5 mL 5 % tørrmelk i TBS med Tween i røret (tabell 2.33). Røret legges til rulling i 1 time i romtemperatur.
- 3) Primærantistoff og minimum 3 mL 5 % tørrmelk i TBS med Tween tilsettes membranen (tabell 2.33 og tabell 2.34). Blandingsforholdet er avhengig av sensitiviteten og hvilken type antistoff som benyttes. Røret legges til rulling på kjølerom over natt.

- 4) Neste dag helles antistoffløsningen av og det vaskes tre ganger 15 minutter med 5 mL TBS med Tween.
- 5) Sekundærantistoff og minimum 3 mL 5 % tørrmelk i TBS med Tween tilsettes og røret legges til rulling (tabell 2.33 og tabell 2.34). Også her er blandingsforholdet avhengig av hvilken type antistoff som benyttes. Røret legges til rulling i romtemperatur i 3-4 timer. Dersom det skal ligge over natt legges det på kjølerommet.
- 6) Antistoffløsningen helles av og det vaskes tre ganger 15 minutter med TBS med Tween i romtemperatur.

Tabell 2.33: Løsninger til blokking, vasking og tilsetting av antistoff

Tris bufret saltvann (TBS) med Tween	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Trizma base	1,21 g
NaCl	4,00 g
Tween 20	0,25 mL
Destillert vann	Ad 500 mL
pH justeres til 7,6 med HCl	
Tween 20 tilsettes etter at pH er justert.	

5 % tørrmelk i TBS med Tween	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>
Tørrmelk	2,5 g
TBS med Tween	50 mL
Oppbevares kjølig. De kontrolleres at den ikke har blitt dårlig før bruk.	

Tabell 2.34: Antistoffer

Primærantistoff	Fortynning
HSP-60, kanin IgG, SC 13966 LOT nr A152 LOT nr K1907	1:200
Lamin A/C, kanin IgG, # 2032S LOT 3	1:1000
Ref-1 (E-17), geit IgG, SC 9919 LOT nr C3110	1:500

Sekundærantistoff	Fortynning
Esel, anti-kanin IgG-HRP, SC 2313 LOT nr C2609 LOT nr A0711	1:10000
Esel, anti-geit IgG-HRP, SC 2020 Lot nr A1207	1:5000

2.12.6 Fremkalling

Ved å tilsette fremkallingsvæske til membranen så vil båndene kunne visualiseres.

Prosedyre for fremkalling av membraner:

- 1) Fremkallingsvæske blandes 1:1. Det brukes enten SuperSignal West Piko eller SuperSignal West Femto. Femto brukes dersom man trenger en mer sensitiv fremkallingsvæske.
- 2) Membranen tas ut av plastrøret ved hjelp av en pinsett og legges på en glassplate med proteinsiden opp. Ca 1 mL fremkallingsvæske pipetteres over membranen. Væsken fordeles godt utover membranen. Fremkallingsvæsken skal ligge på i 5 minutter.
- 3) Væskerester helles av og membranen legges i en plastlomme som er klipt til. Luft kan fjernes ved å stryke forsiktig mot plastomslaget. Membranen fremkalles.
- 4) Etter fremkalling legges membranen tilbake i plastrøret med TBS med Tween og legges til rulling i ca 15 minutter for å vaske av fremkallingsvæsken. Deretter fylles røret opp med TBS med Tween og settes kaldt, eller så kan man strippe membranen og påføre et nytt antistoff.

2.12.7 Stripping av membran

Dersom det er ønskelig å kjøre flere antistoffer på en membran må den strippes før det påføres nytt antistoff. Det tilsettes da en strippebuffer som degraderer proteinbindingene på membranen.

Prosedyre for membranstripping:

- 1) Membranen legges ved hjelp av pinsett i et 50 mL plastrør med proteinsiden mot midten.

- 2) Det tilsettes 5 mL strippebuffer (Western Blot Stripping Buffer) og røret legges til rulling i 15 minutter ved romtemperatur.
- 3) Etter 15 minutter helles strippebufferen av og membranen vaskes med 5 mL TBS med Tween ved romtemperatur i 3 timer.
- 4) Deretter følges prosedyren for blokking og påføring av primærantistoff (se 2.12.5).

2.13 Databehandling og statistisk analyse

Grafer og figurer er laget med Microsoft Excel 2007. Resultatene er angitt som gjennomsnittsverdier med standardfeil (SEM).

Bildebehandling er gjort med programvaren tilhørende Nikon Eclipse TE300 og PhotoFiltre 6.5.2. Westerngeler analyseres med Image J.

Statistisk analyse gjøres med programvaren SigmaStat 3.0. Der to variabler sammenliknes brukes t-test og dersom variablene ikke er normalfordelte benyttes Mann-Whitney Rank Sum Test. Ved sammenlikning av flere variabler som er normalfordelte brukes enveis ANOVA med Dunnett's metode. Dersom variablene ikke er normalfordelte brukes Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns metode. Statistisk signifikans settes til $p < 0,05$ og markeres med * i figurene.

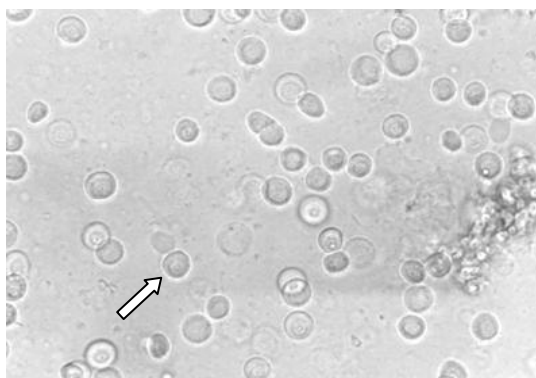
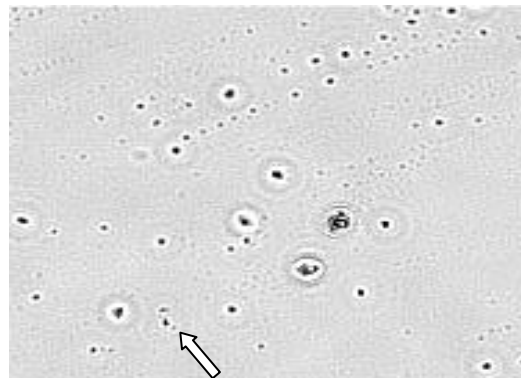
3 Resultater

Da dette forskningsprosjektet ble startet opp ønsket man å studere mitokondriepopulasjoner. Mitokondrier er heterogene og deres egenskaper kan være svært forskjellige. Denne heterogeniteten var også hovedfokus i en tidligere masteroppgave, hvor mye viktig arbeid ble gjort (Austdal 2009). I denne oppgaven bygges det videre på deler av dette arbeidet. Fraksjonenes innhold av andre organeller har blitt undersøkt i lillehjernekornceller fra kylling og rotte og i PC12-celler ved å bruke tre trackere, som lokaliserer til mitokondrier, kjerner og ER, og ved å bruke primærantistoffer mot HSP-60 og lamin. For å separere populasjoner av organeller ble det sentrifugert på fire-seks forskjellige hastigheter, avhengig av hvilken protokoll som ble fulgt (se 2.9). Hastighetene som ble brukt ble beregnet å tilsvare 250g, 500g, 750g, 3000g, 6000g og 10000g. Alle resultatene som ble oppnådd ved separering er normalisert slik at forskjellige forsøk kan sammenliknes med hverandre. Totalsummen av en tracker vil dermed alltid bli 100 %. Innholdet av ulike organeller ble undersøkt i ubehandlede fraksjoner fra kyllingkornceller, rottekornceller og PC12-celler (se 3.1). Separeringsmetoden ble deretter brukt i celledødsmodellene i rottekornceller og PC12-celler (se 3.2 og 3.3).

3.1 Karakterisering av sentrifugeringsfraksjoner i ulike celletyper

3.1.1 Homogenisering

I de tidlige forsøkene gjort i denne oppgaven viste resultatene at det var mye mitokondrier i den første fraksjon (P-250) og under 5 % i hver av de resterende fraksjonene. Dette kunne tyde på en ufullstendig homogenisering med mye hele celler. Det ble derfor homogenisert 20 ganger og 50 ganger før separering. Fraksjonene kunne så studeres i mikroskopet. Det viste seg å være mye hele celler i fraksjonene (figur 3.1). Homogeniseringsprosessen med sprøyte og kanyle ble da endret fra 20 ganger til 50 ganger.

A**B**

Figur 3.1: Homogenisering 50 ganger resulterer i færre hele celler og flere fragmenter. PC12-cellene ble høstet, homogenisert 20 ganger (A) eller 50 ganger (B) og separert på 250g. Fraksjonene ble studert i mikroskop Nikon Eclipse TE300. Bilde A viser at hele celler er tilstede i fraksjon P-250. Pilen viser en celle. Bilde B viser at det er færre hele celler og flere fragmenterte celler i fraksjonen. Pilen viser et fragment. Bildene er tatt med Nikon Digital Sight DSQi1MC med 40X forstørrelse.

3.1.2 Farging av celler med ulike trackere

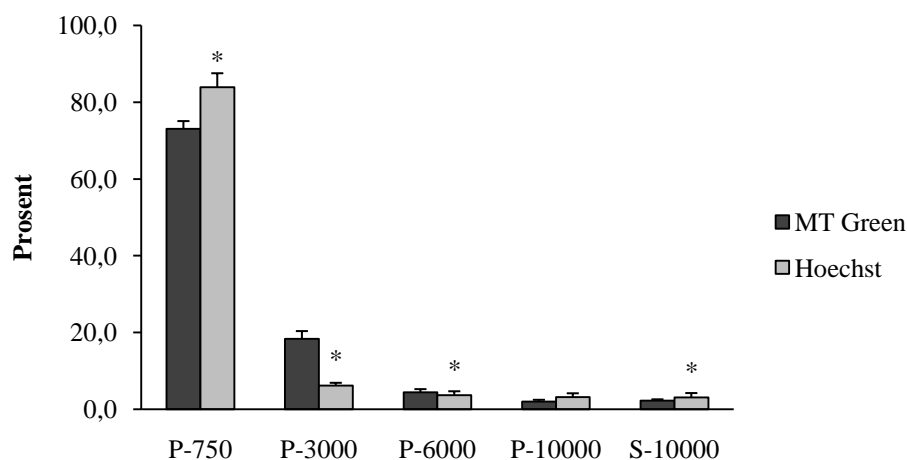
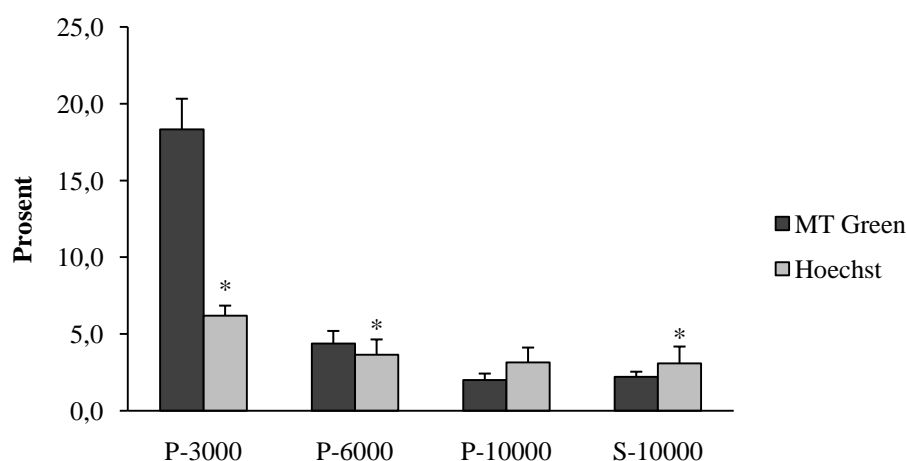
Fordi ulike trackere skulle tilsettes i de samme skålene ble det undersøkt om noen av dem ville avleses på de samme bølgelengdene. De ulike trackerene (MitoTracker Green, Hoechst og ER-tracker) ble tilsatt i ulike skåler med PC12-celler, høstet, homogenisert og separert. Fraksjonene ble deretter satt på en 96-brønnsplate og avlest i plateleser på de aktuelle bølgelengdene. Ingen av trackerne ble avlest på andre bølgelengder enn det som var oppgitt.

3.1.3 Rottekornceller

Fluorescensmåling med MT Green og Hoechst

Korncellene ble dyrket 7 dager *in vitro*, farget opp med MT Green og Hoechst i 20 minutter, homogenisert og deretter sentrifugert på fire hastigheter (750g, 3000g, 6000g og 10000g). Det ga opphav til fem fraksjoner. Fluorescensen i fraksjonene ble avlest i plateleser (figur 3.2).

MT Green og Hoechst fordeles ulikt i fraksjonene. Det aller meste av kjernene kom ut i den tyngste fraksjonen (P-750) mens P-3000 var inneholdt mer mitokondrier enn kjerner.

A**B**

Figur 3.2: Kjerner og mitokondrier i fraksjoner fra rottekornceller har et ulikt fordelingsmønster målt med MT Green og Hoechst. Korncellene ble dyrket 7 dager *in vitro*. De ble farget opp med MT Green og Hoechst, høstet, homogenisert og sentrifugert på fire hastigheter (750g, 3000g, 6000g og 10000g), noe som ga opphav til fem fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Fluorescensen ble avlest i plateleser. Figur A viser totalfordelingen i fraksjonene mens figur B viser fordelingen i de fire siste fraksjonene med en ny y-akse. Det brukes gjennomsnitt med standardfeil (SEM) i figuren (n=10 fra to ulike prepareringer). *= p < 0,05. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tabell 3.1 viser tallene figuren er basert på.

Tabell 3.1: Tall til figur 3.2

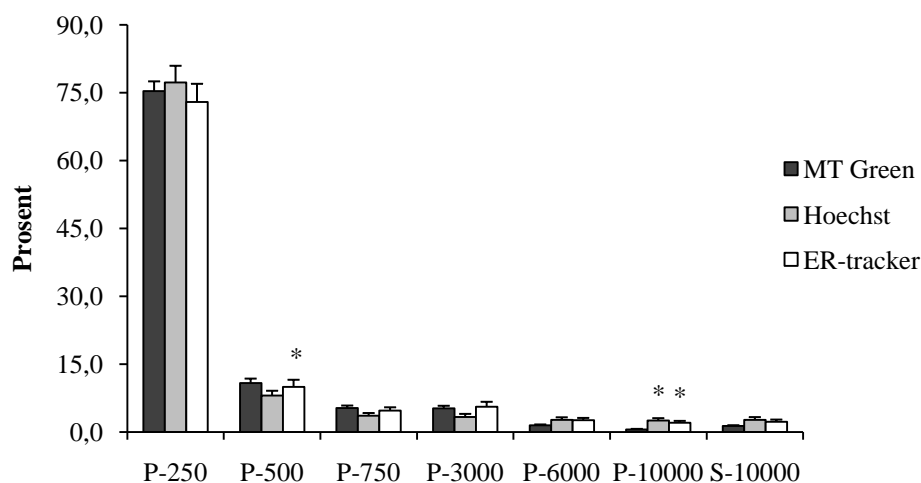
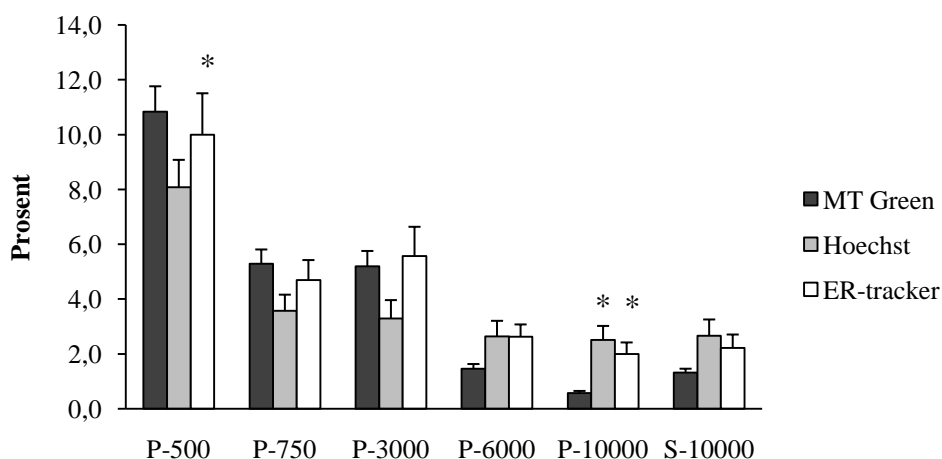
MT Green	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	73,1	2,0	10
	P-3000	18,3	2,0	10
	P-6000	4,4	0,8	10
	P-10000	2,0	0,4	10
	S-10000	2,2	0,3	10
Hoechst	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	83,9	3,6	10
	P-3000	6,2	0,7	10
	P-6000	3,6	1,0	10
	P-10000	3,1	1,0	10
	S-10000	3,1	1,1	10

3.1.4 Kyllingkornceller

Fluorescensmåling med MT Green, Hoechst og ER-tracker

Korncellene ble dyrket 3 dager *in vitro*. De ble deretter farget med MT Green og Hoechst eller MT Green og ER-tracker, høstet, homogenisert og separert på seks hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g, 6000g og 10000g). Sentrifugeringen ga opphav til sju fraksjoner og fluorescensen i hver fraksjon ble avlest i plateleser.

I figuren nedenfor (figur 3.3) er innholdet av MT Green, Hoechst og ER-tracker sammenliknet med hverandre innad i hver fraksjon. Den tyngste fraksjonen (P-250) hadde høyest innhold av mitokondrier, men det var også her innholdet av ER og kjerner var på sitt høyeste. Fraksjon P-500, den nest tyngste, var fraksjonen med høyest innhold av mitokondrier i forhold til kjerne- og ER-innhold. Det var lite mitokondrier (< ~5 %) igjen i de siste fraksjonene og flere av disse fraksjonene inneholder mer kjerner og ER enn mitokondrier.

A**B**

Figur 3.3: Organellefordelingen er ulik i fraksjoner fra kyllingkornceller farget opp med MT Green, Hoechst og ER-tracker. Korncellene ble dyrket 3 dager *in vitro*. De ble deretter farget opp med MT Green og Hoechst eller MT Green og ER-tracker, høstet, homogenisert og sentrifugert på seks hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g, 6000g og 10000g), noe som ga opphav til sju fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Fluorescensen ble avlest i plateleser. Figur A viser totalfordelingen i fraksjonene mens figur B viser fordelingen i de seks siste fraksjonene med en ny y-akse. Det brukes gjennomsnitt med standardfeil (SEM) i figuren, (n=32 for MT Green. n= 16 for Hoechst og ER-tracker). *= signifikant i forhold til MT Green. * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med enveis ANOVA med Dunnett's metode og Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns metode. Tabell 3.2 viser tallene figuren er basert på.

Tabell 3.2: Tall til figur 3.3

MT Green	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-250	75,3	2,1	32
	P-500	10,8	0,9	32
	P-750	5,3	0,5	32
	P-3000	5,2	0,6	32
	P-6000	1,5	0,2	32
	P-10000	0,6	0,1	32
	S-10000	1,3	0,1	32
Hoechst	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-250	77,2	3,7	16
	P-500	8,1	1,0	16
	P-750	3,6	0,6	16
	P-3000	3,3	0,7	16
	P-6000	2,6	0,6	16
	P-10000	2,5	0,5	16
	S-10000	2,7	0,6	16
ER-tracker	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-250	72,9	4,0	16
	P-500	10,0	1,5	16
	P-750	4,7	0,7	16
	P-3000	5,6	1,1	16
	P-6000	2,6	0,5	16
	P-10000	2,0	0,4	16
	S-10000	2,2	0,5	16

Westernanalyse

Det ble kjørt Westernanalyser på fraksjonene som en alternativ metode til fluorescensmålingene. Det ble satt på like store mengder protein av hver fraksjon for å se på innholdet av mitokondrier og kjerner.

Kjerneinnhold i fraksjonene målt med Lamin A/C

Laminer er strukturelle komponenter som finnes i kjernemembranen i celler (Gruenbaum, Wilson et al. 2000). Primærantistoffet Lamin A/C (tabell 2.34), som har en molekylvekt på 70 kDa, ble benyttet for å se på innholdet av kjerner i fraksjonene. Resultatene viste at fraksjon P-250 var mest anriket av kjerner, slik som fluorescensmålingene med Hoechst også viste

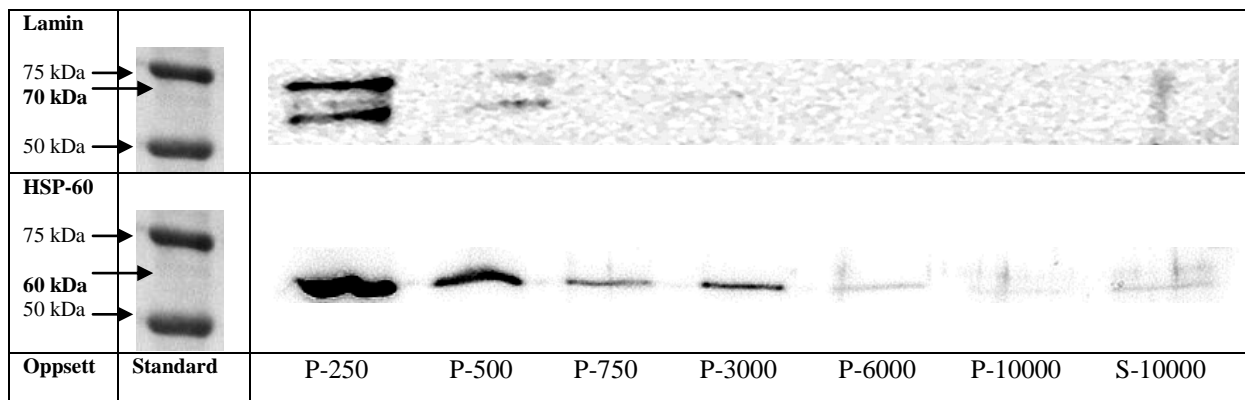
(figur 3.3). De tre siste fraksjonene (P-6000, P-10000 og S-10000) inneholdt ikke kjerner målt med antistoffet Lamin A/C (figur 3.4 A og B).

Mitokondrieinnhold i fraksjonene målt med HSP-60

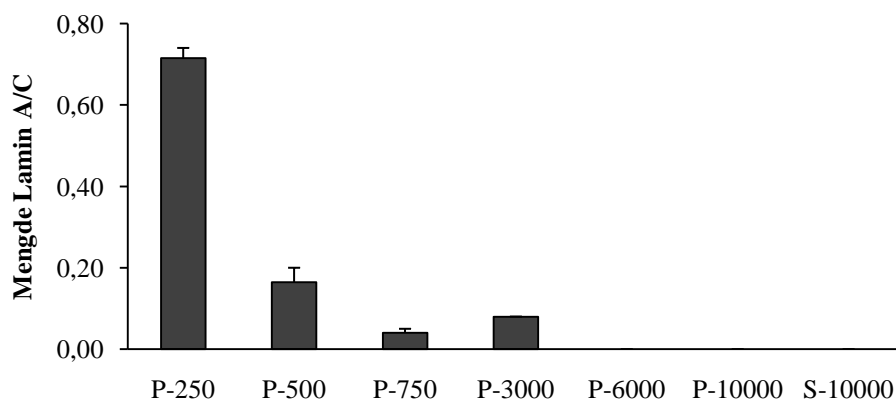
HSP-60 (heat shock protein 60) ble brukt som en mitokondriemarkør. HSP-60 (tabell 2.34) er et protein som hovedsakelig er lokalisert i mitokondriene (Cheng, Hartl et al. 1990). Dette gjør den til en markør som kan brukes som et mål på mitokondrieinnhold i fraksjonene. HSP-60 har en molekylvekt på 60 kDa.

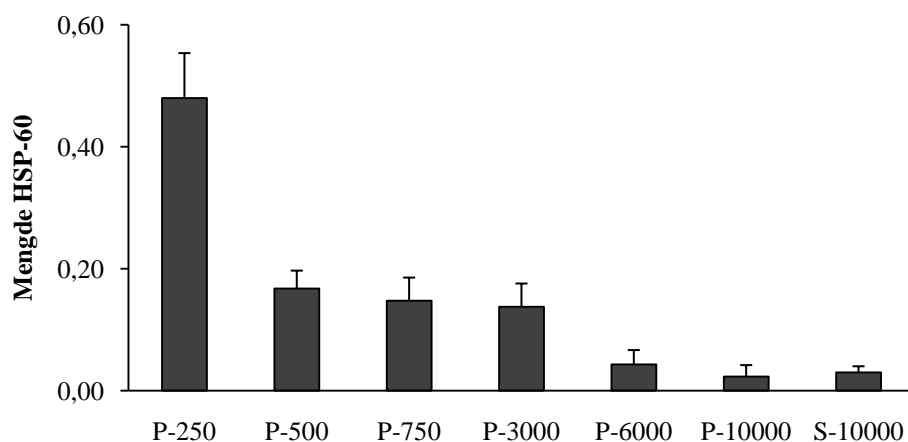
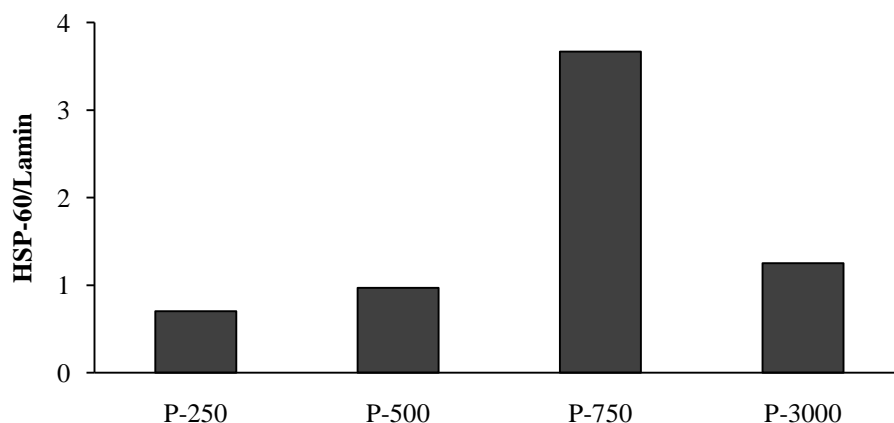
Fraksjonen P-250 ble funnet til å være mest anriket, etterfulgt av P-500, P-750 og P-3000. P-10000 var fraksjonen som var minst anriket av mitokondrier målt med HSP-60 (figur 3.4 A og C). P-750 var fraksjonen som var mest anriket på mitokondrier om forholdet mellom kjerner og mitokondrier beregnes (figur 3.4 D).

A



B



C**D**

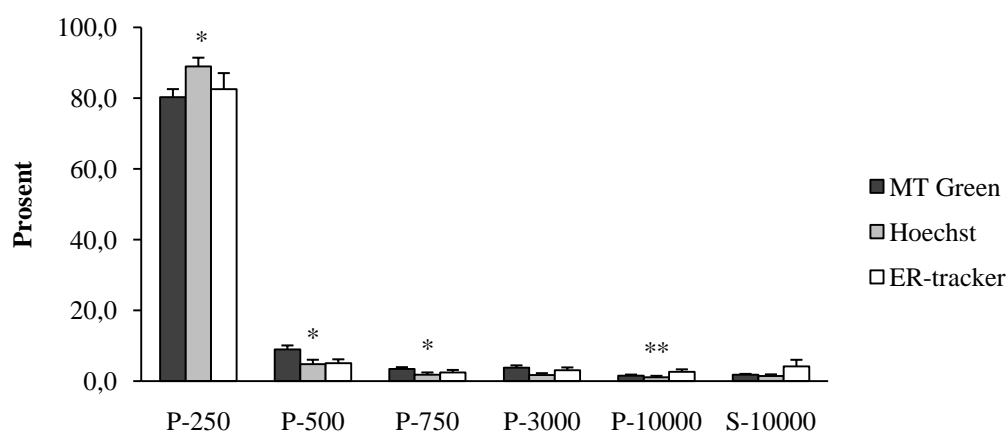
Figur 3.4: Kyllingkorncellefraksjoner inneholder ulike mengder mitokondrier og kjerner. Kyllingkorncellene ble høstet, homogenisert og separert etter 3 dagers dyrkning *in vitro*. Det ble separert på seks forskjellige hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g, 6000g og 10000g), noe som ga opphav til sju fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Det ble så kjørt Westernanalyse på alle disse fraksjonene. Etter fremkalling ble intensiteten på båndene beregnet og dette er et mål på organelleinnhold. Mengde HSP-60 blir oppgitt som relative verdier i forhold til samlet mengde HSP-60 i alle fraksjonene. Dette gjelder også for Lamin A/C. Figur A viser båndene etter fremkalling, figur B viser kvantifiseringen av kjerneinnholdet målt med Lamin A/C, figur C viser kvantifiseringen av mitokondriinnholdet målt med HSP-60 og figur D viser forholdet mellom HSP-60 og Lamin A/C. Fordi det ikke ble funnet kjerner i P-6000, P-10000 og S-10000 vises kun de fire første fraksjonene i figur D. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) brukes (n=3).

3.1.5 PC12-celler

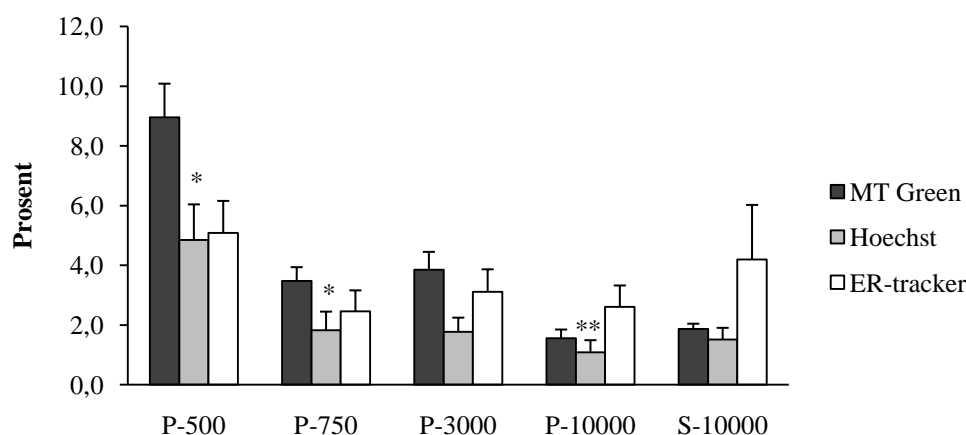
Fluorescensmåling med MT Green, Hoechst og ER-tracker

PC12-celler ble separert i seks fraksjoner etter at de var farget opp med trackere, MT Green og Hoechst eller MT Green og ER-tracker, og høstet. Hastighetene som ble benyttet tilsvarte 250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g. Mitokondriene var i størst grad fordelt på de to første fraksjonene (figur 3.5). Den første fraksjonen (P-250) inneholdt mest organeller mens fraksjon P-500 var fraksjonen som inneholdt mest mitokondrier sammenliknet med kjerneinnholdet og ER-innholdet. Alle fraksjonene som følger etter P-250 inneholdt lite organeller i forhold til P-250.

A



B



Figur 3.5: PC12-cellefraksjonenes innhold av mitokondrier, kjerner og ER er forskjellig. Cellene ble farget opp med MT Green og Hoechst eller MT Green og ER-tracker i ca 20 minutter før de ble høstet, homogenisert og separert på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g). Separasjonen ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Fluorescensen ble avlest i plateleser. Figur A viser totalfordelingen i fraksjonene mens figur B viser fordelingen i de fem siste fraksjonene med en ny y-akse. Det brukes gjennomsnitt med standardfeil (SEM) (n=23 for MT Green. n= 13 for Hoechst og ER-tracker). *= signifikant i forhold til MT Green, **= signifikant i forhold til ER-tracker. * og ** = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med enveis ANOVA med Dunnett's metode og Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns metode. Tabell 3.3 viser tallene figuren er basert på.

Tabell 3.3: Tall til figur 3.5

MT Green	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-250	80,3	2,3	23
	P-500	9,0	1,1	23
	P-750	3,5	0,5	23
	P-3000	3,8	0,6	23
	P-10000	1,6	0,3	23
	S-10000	1,9	0,2	23
Hoechst	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-250	89,0	2,5	13
	P-500	4,8	1,2	13
	P-750	1,8	0,6	13
	P-3000	1,8	0,5	13
	P-10000	1,1	0,4	13
	S-10000	1,5	0,4	13

ER-tracker	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-250	82,6	4,5	13
	P-500	5,1	1,1	13
	P-750	2,5	0,7	13
	P-3000	3,1	0,7	13
	P-10000	2,6	0,7	13
	S-10000	4,2	1,8	13

Westernanalyse

Det ble også i PC12-celler kjørt Westernanalyse som en alternativ metode for å bestemme kjerne- og mitokondrieinnholdet i fraksjonene. Det ble satt på like store mengder protein av hver fraksjon.

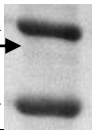

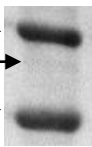
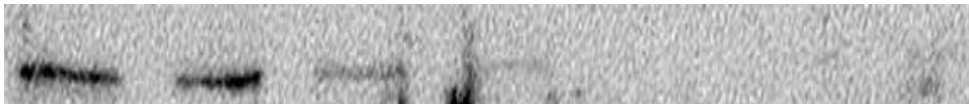
Kjerneinnhold målt med Lamin A/C

PC12-cellene ble undersøkt med primærstoffet Lamin A/C (molekylvekt = 70 kDa) for å bestemme kjerneinnholdet. Det viste seg at den tyngste fraksjonen (P-250) var mest anrikt på kjerner (figur 3.6 A og B) mens tre siste fraksjonene inneholdt veldig lite kjerner.

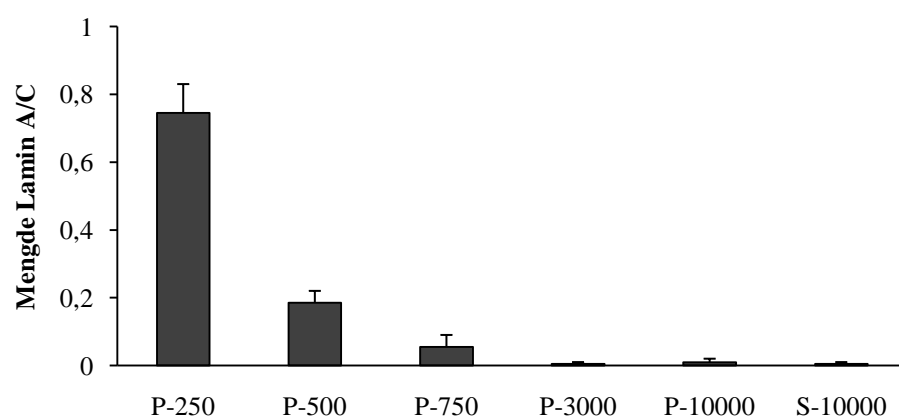
Mitokondrieinnhold målt med HSP-60

Mitokondrieinnholdet ble målt med HSP-60 (molekylvekt = 60 kDa) og fraksjonene P-250, P-500, P-750 og P-3000 så ganske jevne ut i mitokondrieinnhold mens P-10000 og S-10000 inneholdt veldig lite mitokondrier (figur 3.6 A og C). P-3000 var mest anrikt på mitokondrier, men også P-750 hadde mye mitokondrier i forhold til kjerner (figur 3.6 D).

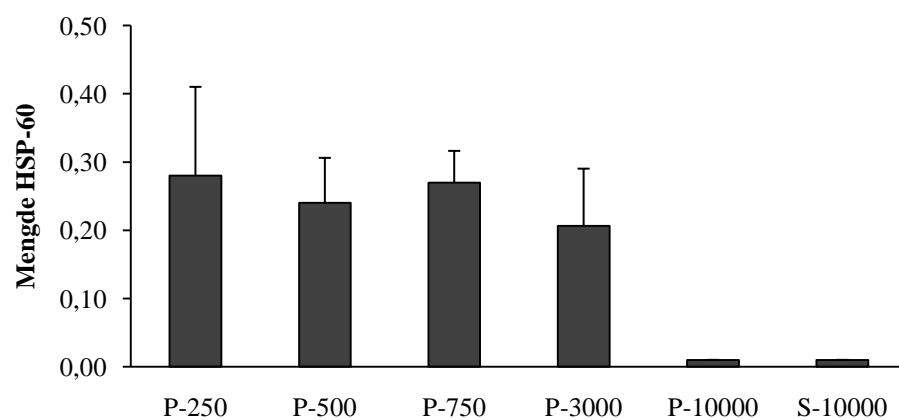
A

Lamin							
75 kDa →							
70 kDa →							
50 kDa →							
HSP-60							
75 kDa →							
60 kDa →							
50 kDa →							
Oppsett	Standard	P-250	P-500	P-750	P-3000	P-10000	S-10000

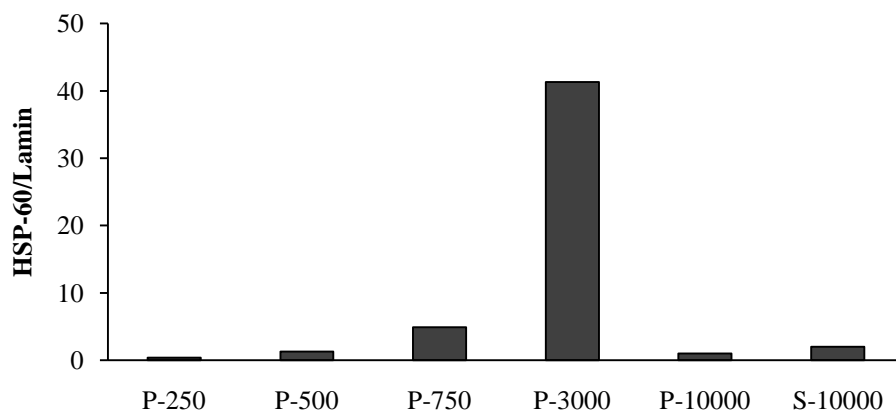
B



C



D



Figur 3.6: PC12-cellefraksjoner inneholder ulike mengder mitokondrier og kjerner.

PC12-cellene ble høstet, homogenisert og separert på fem forskjellige hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som gav opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Det ble kjørt Westernanalyse på alle fraksjonene. Etter fremkalling ble intensiteten på båndene beregnet og dette er et mål på mengde organeller. Mengde HSP-60 oppgis som relative verdier i forhold til samlet mengde HSP-60 i alle fraksjonene. Det samme gjelder for Lamin A/C. Figur A viser båndene etter fremkalling, figur B viser innholdet av kjerner målt med Lamin A/C, figur C viser kvantifiseringen av innholdet av mitokondrier målt med HSP-60 og figur D viser forholdet mellom Lamin A/C og HSP-60. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) brukes (n=2).

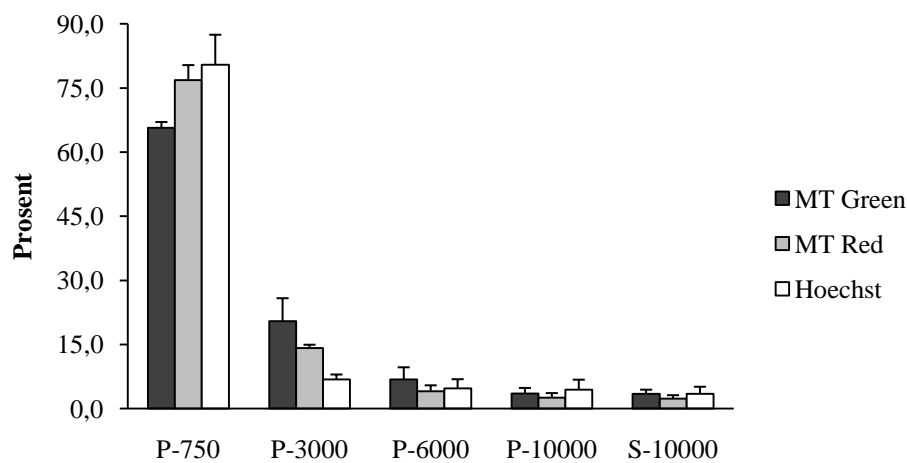
3.2 Glutamateksponering av rottekornceller

Fluorescensmåling med MT Green, MT Red og Hoechst

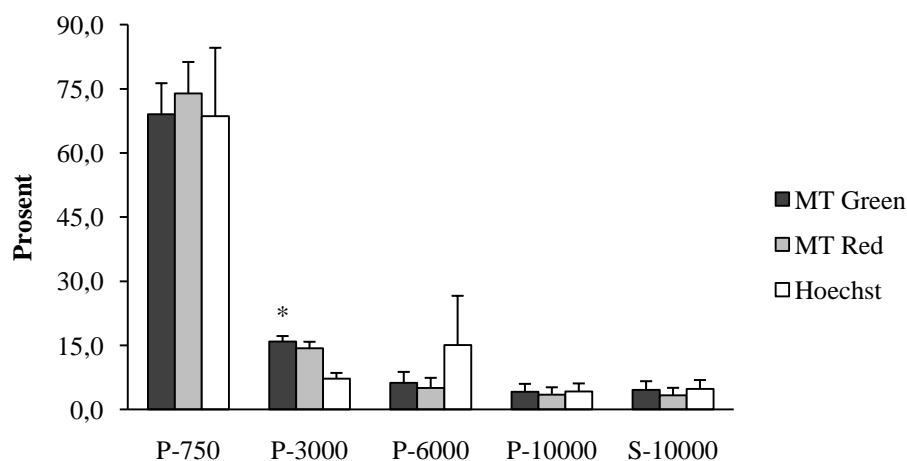
Separeringsmetoden ble brukt for å separere rottekornceller og måle fluorescens etter at de var glutamateksponert og farget opp med MT Green, MT Red og Hoechst. Korncellene ble høstet to timer etter at de var eksponert. Deretter ble de separert i fraksjoner for å undersøke om organellefordelingen og den mitokondrielle ROS-produksjonen endret seg etter glutamateksponering. Det ble benyttet rottekornceller til glutamatforsøkene fordi det ikke var glutamatdød i kyllingkorncellene. Korncellene var enten ubehandlet, bufferbehandlet (Lockes bufferløsning med Mg^{2+}) eller glutamatbehandlet (Lockes bufferløsning uten Mg^{2+} med 100 μM glutamat og 10 μM glysin). Bufferløsningen som ble brukt var tilsatt Mg^{2+} for at NMDA-reseptorene skulle blokkeres. Figurene er basert på tre paralleller fra to separate prepareringer (figur 3.7 og 3.8). Resultatene fra de tre forsøkene viste at det var en tendens til at kornceller behandlet med glutamat og buffer hadde et lavere innhold av kjerner i de tyngste fraksjonene

sammenliknet med ubehandlede kornceller (figur 3.8). Den mitokondrielle ROS-produksjonen ble målt med MT Red og den så ut til å være høyest i den tyngste fraksjonen, noe som gjaldt for alle behandlingene (figur 3.8 B). Mens det for mitokondrier ble funnet en anrikning i forhold til kjerner i bufferbehandlet P-3000 var det ikke lenger slik i de andre fraksjonene (figur 3.7 B).

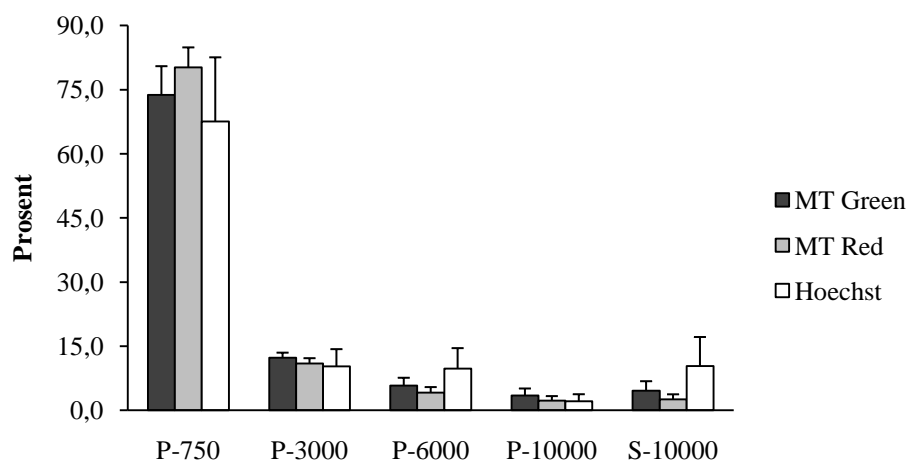
A - ubehandlet



B - bufferbehandlet



C - glutamatbehandlet



Figur 3.7: Behandlede og ubehandlede rottekorncellers organellefordeling er ikke forskjellig i fraksjonene, men i bufferbehandlingen er det mer mitokondrier enn kjerner i P-3000. Rottekorncellene ble høstet etter 7 dagers dyrkning *in vitro*. De ble farget opp med MT Green, MT Red og Hoechst 45 minutter før høsting. De ble deretter homogenisert og separert ved sentrifugering på fire hastigheter (750g, 3000g, 6000g og 10000g), noe som ga opphav til fem fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Figur A viser fordelingen i ubehandlede kornceller, figur B etter bufferbehandling og figur C viser fordelingen etter glutamatbehandling. * = $p < 0,05$ (i bufferbehandling i B var MT Green signifikant i forhold til Hoechst). Statistisk analyse er gjort med Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns metode. Figurene viser gjennomsnitt med standardfeil (SEM) ($n= 3$). Tallene figurene A-C er basert på finnes i tabell 3.4.

Tabell 3.4: Tall til figur 3.7 A-C

A – ubehandlet:

MT Green	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	65,7	1,3	3
	P-3000	20,4	5,4	3
	P-6000	6,8	2,8	3
	P-10000	3,6	1,3	3
	S-10000	3,4	1,0	3
MT Red	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	76,8	3,5	3
	P-3000	14,2	0,7	3
	P-6000	4,1	1,4	3
	P-10000	2,6	1,0	3
	S-10000	2,4	0,8	3

Hoechst	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	80,5	7,0	3
	P-3000	6,8	1,2	3
	P-6000	4,8	2,1	3
	P-10000	4,5	2,3	3
	S-10000	3,5	1,6	3

B – bufferbehandling:

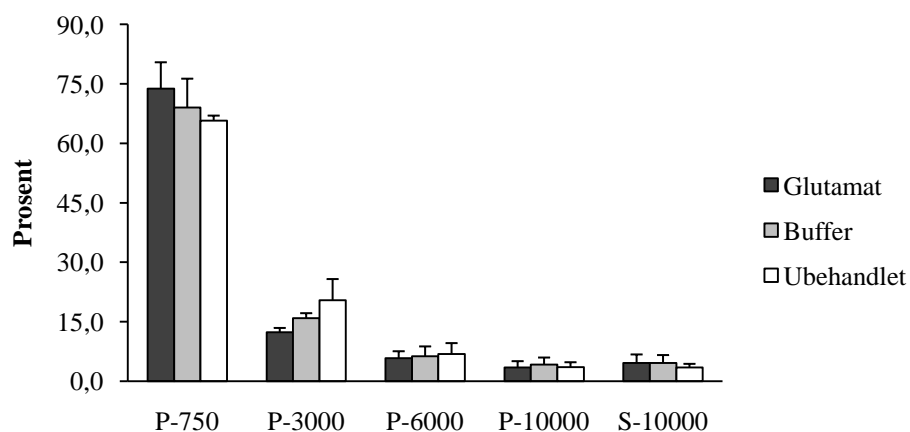
MT Green	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	69,0	7,3	3
	P-3000	15,9	1,3	3
	P-6000	6,3	2,5	3
	P-10000	4,2	1,8	3
	S-10000	4,6	2,0	3
MT Red	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	73,9	7,4	3
	P-3000	14,3	1,6	3
	P-6000	5,1	2,5	3
	P-10000	3,4	1,8	3
	S-10000	3,3	1,8	3
Hoechst	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	68,6	16,0	3
	P-3000	7,2	1,3	3
	P-6000	15,1	11,5	3
	P-10000	4,2	1,9	3
	S-10000	4,8	2,1	3

C – glutamatbehandling:

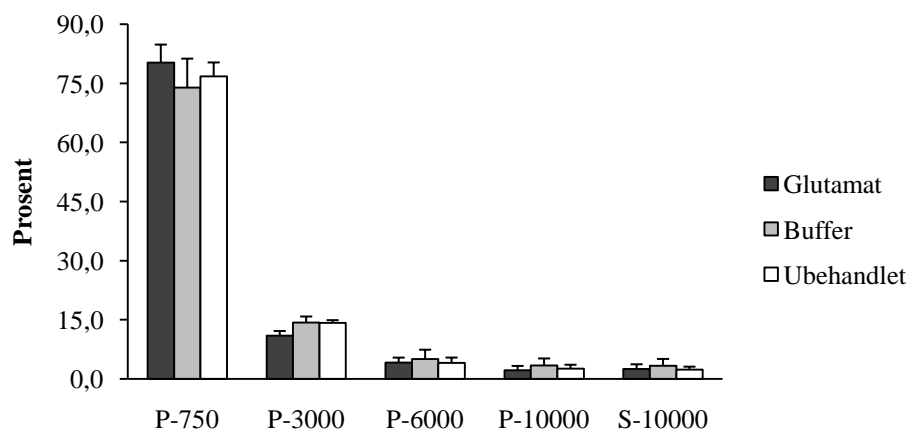
MT Green	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	73,8	6,7	3
	P-3000	12,3	1,1	3
	P-6000	5,8	1,8	3
	P-10000	3,5	1,6	3
	S-10000	4,6	2,2	3

MT Red	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	80,2	4,6	3
	P-3000	10,9	1,2	3
	P-6000	4,1	1,3	3
	P-10000	2,2	1,1	3
	S-10000	2,5	1,2	3
Hoechst	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	67,5	15	3
	P-3000	10,3	4,0	3
	P-6000	9,7	4,8	3
	P-10000	2,1	1,6	3
	S-10000	10,3	6,8	3

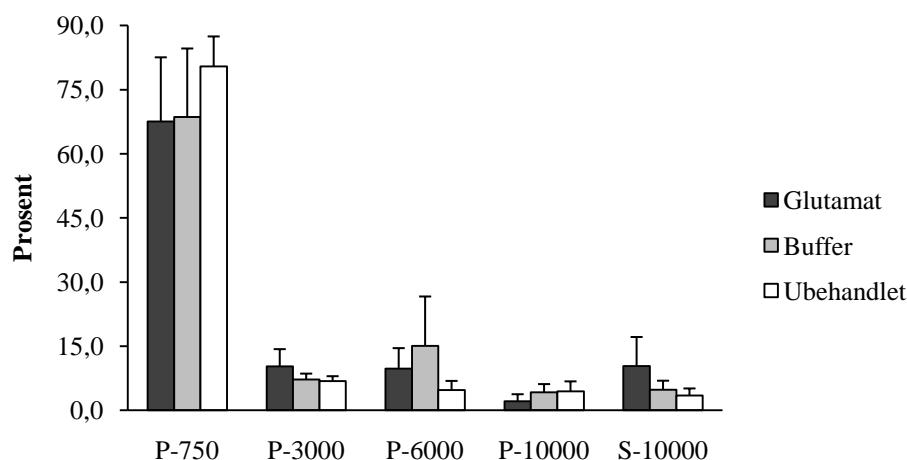
A - MT Green



B - MT Red



C - Hoechst



Figur 3.8: Organelleinnholdet i fraksjonene er ikke forskjellig i de ulike behandlingene. Rottekorncellene ble høstet etter 7 dagers dyrkning *in vitro*. De ble farget opp med MT Green, MT Red og Hoechst 45 minutter før høsting. De ble deretter homogenisert og separert ved sentrifugering på fire hastigheter (750g, 3000g, 6000g og 10000g), noe som ga opphav til fem fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Figur A viser fordelingen av mitokondrier, målt med MT Green, i de tre behandlingene, figur B viser ROS-produksjonen målt med MT Red og figur C viser kjernefordelingen målt med Hoechst. * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks med Dunns metode. Figurene viser gjennomsnitt med standardfeil (SEM) ($n = 3$). Tallene figurene A-C er basert på finnes i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Tall til figur 3.8

A – MT Green:

Glutamat-behandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	73,8	6,7	3
	P-3000	12,3	1,1	3
	P-6000	5,8	1,8	3
	P-10000	3,5	1,6	3
	S-10000	4,6	2,2	3
Buffer-behandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	69,0	7,3	3
	P-3000	15,9	1,3	3
	P-6000	6,3	2,5	3
	P-10000	4,2	1,8	3
	S-10000	4,6	2,0	3

Ubehandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	65,7	1,3	3
	P-3000	20,4	5,4	3
	P-6000	6,8	2,8	3
	P-10000	3,6	1,3	3
	S-10000	3,4	1,0	3

B – MT Red:

Glutamat-behandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	80,2	4,6	3
	P-3000	10,9	1,2	3
	P-6000	4,1	1,3	3
	P-10000	2,2	1,1	3
	S-10000	2,5	1,2	3
Buffer-behandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	73,9	7,4	3
	P-3000	14,3	1,6	3
	P-6000	5,1	2,5	3
	P-10000	3,4	1,8	3
	S-10000	3,3	1,8	3
Ubehandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	76,8	3,5	3
	P-3000	14,2	0,7	3
	P-6000	4,1	1,4	3
	P-10000	2,6	1,0	3
	S-10000	2,4	0,8	3

C – Hoechst:

Glutamat-behandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	67,5	15	3
	P-3000	10,3	4,0	3
	P-6000	9,7	4,8	3
	P-10000	2,1	1,6	3
	S-10000	10,3	6,8	3

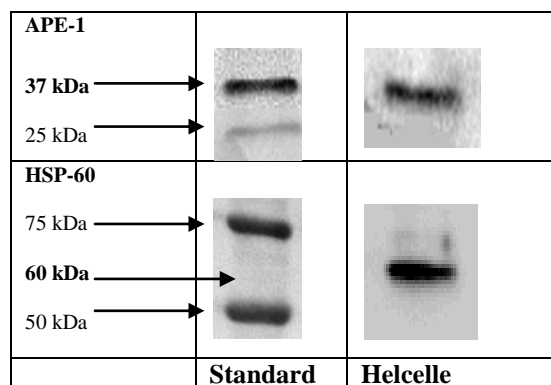
Buffer-behandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	68,6	16,0	3
	P-3000	7,2	1,3	3
	P-6000	15,1	11,5	3
	P-10000	4,2	1,9	3
	S-10000	4,8	2,1	3
Ubehandlet	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-750	80,5	7,0	3
	P-3000	6,8	1,2	3
	P-6000	4,8	2,1	3
	P-10000	4,5	2,3	3
	S-10000	3,5	1,6	3

Westernanalyse

Innhold av mitokondrier, kjerner og AP-endonuklease 1 i fraksjonene

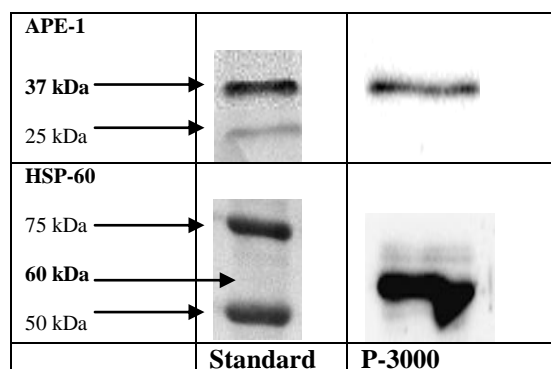
Det ble høstet kornceller fra rotte samt kjørt Westernanalyse på tidligere høstete prøver (høstet mai 2009 og juni 2010). Bakgrunnen for dette var å studere lokaliseringen av reparasjonsenzymet APE-1 (se 1.2.4), i fraksjonene. Tidligere har det blitt funnet en oppregulering i enzymaktivitet i P-750 i glutamatbehandlede celler sammenliknet med ubehandlede celler (Austdal 2009). Det ble kjørt Westernanalyse på nyhøstete prøver og tidligere høstete prøver (høstet juni 2010). Det ble satt på lik proteinmengde av hver fraksjon på de ulike gelene. P-10000 og S-10000 inneholdt ikke nok protein og ble derfor ikke analysert med Westernanalyse.

Primærantistoffet mot APE-1 (molekylvekt = 37 kDa) detekterte et bånd med molekulvekt 37 kDa i en helcelleprøve fra rottekornceller (figur 3.9). I den samme prøven ble det også HSP-60 detektert.



Figur 3.9: APE-1 og mitokondrier kan detekteres i helcelleprøver. Korncellene ble høstet (DIV 7) ved en tidligere rottepreparering i juni 2010 og fryst ned (- 70 °C). Prøvene ble analysert med Westernanalyse. Etter fremkalling ble membranen strippet og nytt primærantistoff ble påsatt. Figuren viser båndene som ble detektert i helcelleprøven.

Det ble videre valgt en fraksjon (P-3000) som ikke hadde bånd for kjernemarkøren Lamin A/C, men mitokondriemarkøren HSP-60 (figur 3.10), for å se om det var mulig å detektere APE-1. I denne fraksjonen ble det detektert et bånd på 37 kDa, den samme molekylvekten som antistoffet mot APE-1 hadde.

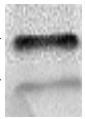
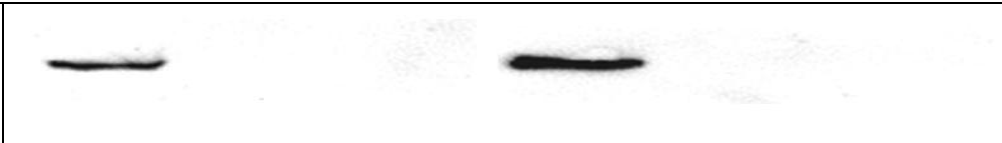
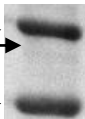

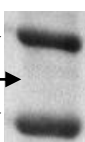



Figur 3.10: APE-1 kan detekteres fraksjon P-3000 som ikke inneholder kjernemarkør, men mitokondriemarkør. Korncellene ble høstet (DIV 7) ved en tidligere rottepreparering i juni 2010 og fryst ned (- 70 °C). Prøvene ble analysert med Westernanalyse. Etter fremkalling ble membranen strippet og nytt primærantistoff ble påsatt. Figurene viser båndene som ble detektert i fraksjonen.

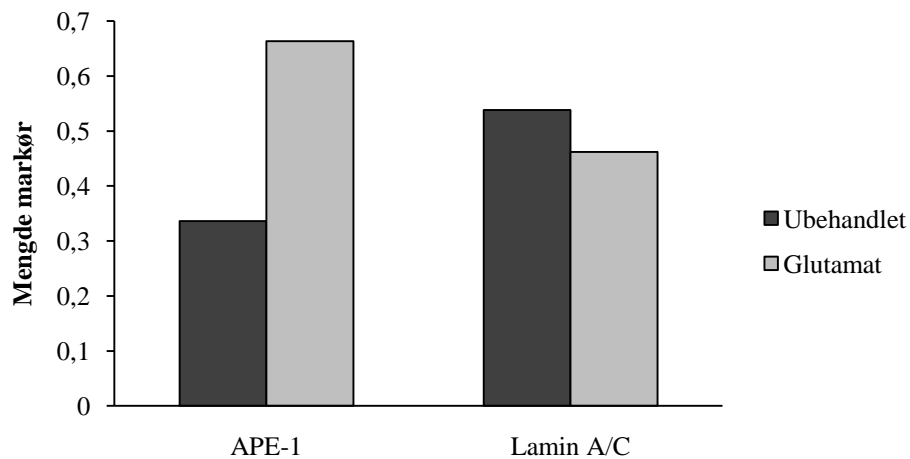
Etter at prøvene fra juni 2010 var analysert ble nye rottekornceller glutamateksponert og høstet, homogenisert, separert og analysert med Westernanalyse. Alle fraksjonene inneholdt mitokondriemarkøren HSP-60, men det var kun P-750 som inneholdt kjernemarkøren Lamin A/C og markøren for APE-1 (figur 3.11 A). I fraksjon P-750 fra glutamatbehandlede kornceller ble det funnet en økning i APE-1- anrikningen i forhold til P-750 i ubehandlede

kornceller (figur 3.11 B). Det var dobbelt så mye APE-1 i P-750 fra glutamatbehandlete kornceller sammenliknet med P-750 fra ubehandlede kornceller. Innholdet av Lamin A/C i P-750 var ganske likt mens ubehandlede kornceller inneholdt mer HSP-60. Unntak var P-6000 fra glutamatbehandlete kornceller som inneholdt dobbelt så mye HSP-60 (figur 3.11 B og C).

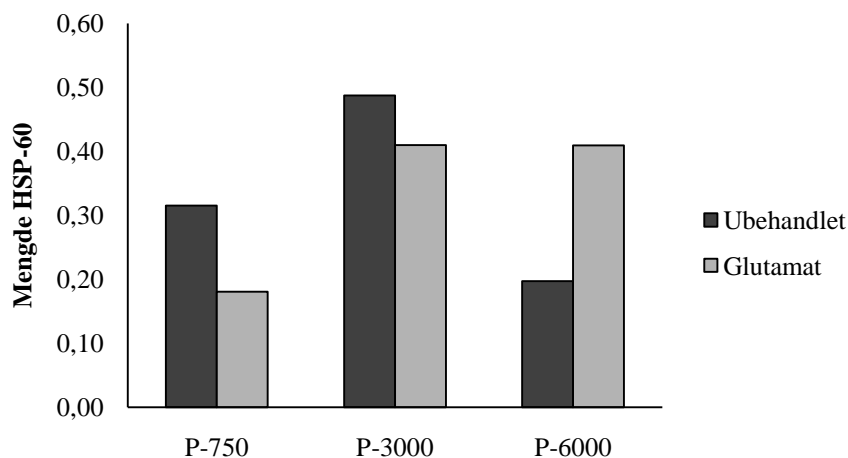
A

APE-1							
Lamin							
HSP-60							
Oppsett	Standard	750 ubeh.	3000 ubeh.	6000 ubeh.	750 glutamat	3000 glutamat	6000 glutamat

B



C



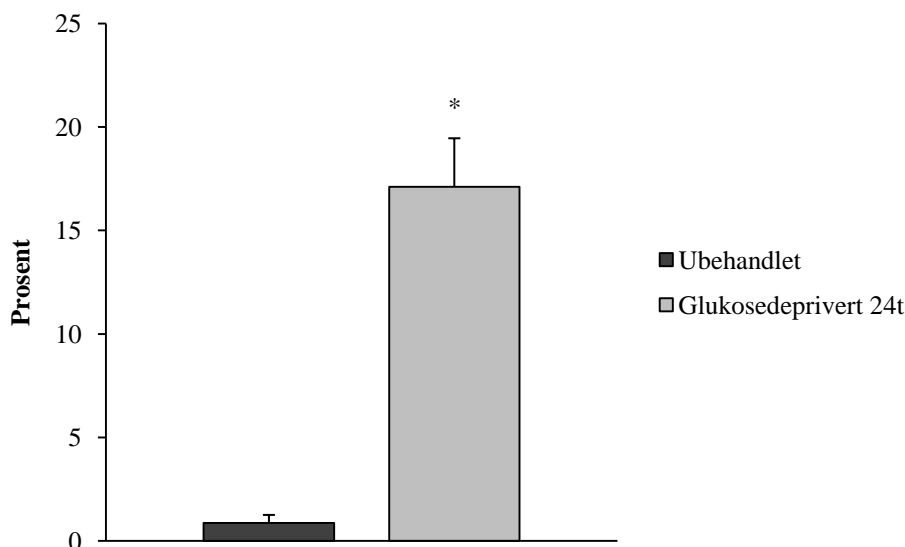
Figur 3.11: Den tyngste fraksjonen i rottekornceller inneholder APE-1, men det er dobbelt så mye APE-1 tilstede i P-750 fra glutamatbehandlede kornceller. Rottekornceller ble dyrket 7 dager *in vitro*. Deretter ble de høstet, homogenisert og separert på fire hastigheter. Fraksjon P-750, P-3000 og P-6000 ble satt på gel og analysert markører for APE-1, kjerner og mitokondrier. Etter hver fremkalling ble membranen strippet og påsatt nytt primærantistoff. Figur A viser båndene etter fremkalling, figur B viser kvantifiseringen av innholdet av APE-1 og kjerner målt med egnete markører og figur C viser kvantifiseringen av innholdet av mitokondrier målt med mitokondriemarkør (n=1). Mengde kjernemarkør og APE-1-markør oppgis som relative verdier i forhold til samlet mengde markør i alle fraksjonene. Mengde HSP-60 oppgis som relative verdier i forhold til samlet mengde HSP-60 i ubehandlede fraksjoner og glutamatbehandlede fraksjoner.

3.3 Glukosedepriivering av PC12-celler

Glukosedepriivering kan brukes som celledødsmodell og det er i tidligere studier vist at glukosedepriivering blant annet induserer ROS-produksjon som fører til celledød (Liu, Song et al. 2003; Isaev, Stelmashook et al. 2008). Det var her interessant å se om organellefordelingen og den mitokondrielle ROS-produksjonen i fraksjonene endret seg dersom cellene ble glukosedepriivert. Det ble sentrifugert på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g) og det ga opphav til seks fraksjoner. Glukosedepriivering ga celledød etter 24 timer, men for å se om det var mulig å observere en endring i produksjonen av ROS på et tidligere tidspunkt, ble det høstet og separert etter både 4 timer og 24 timer.

3.3.1 Celledød

For å undersøke om glukosedepriveringen førte til celledød ble PC12-cellene glukosedeprivert, farget med trypanblå og talt i hvert glukosedepriveringsforsøk. Celledød ble talt etter 24 timers glukosedeprivering. Glukosedeprivering ga en økning i celledød sammenliknet med ubehandlet kontroll og kan brukes som en *in vitro*-modell for celledød (figur 3.12).



Figur 3.12: Glukosedeprivering gir en økning i celledød. Tallene er gjengitt som gjennomsnitt med standardfeil (SEM) (ubehandlet n= 14, glukosedeprivert n= 21). * = p < 0,05. Statistisk analyse er gjort med t-test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.6.

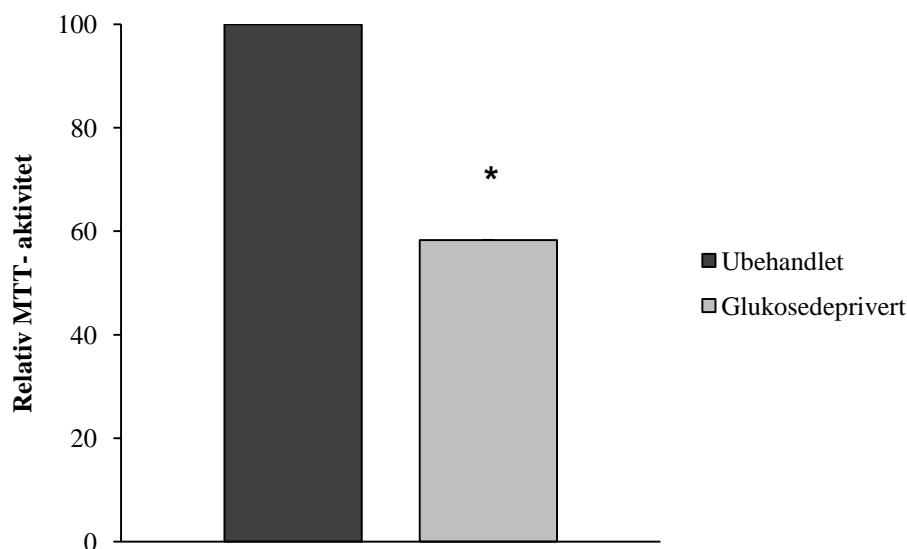
Tabell 3.6: Tall til figur 3.12

Behandling	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	0,9	0,4	14
Glukosedeprivert	17,1	2,3	21

3.3.2 MTT-assay

Fordi glukose er essensielt for cellenes viabilitet ble det studert hvordan glukosedepriveringen påvirket PC12-cellene og mitokondrieaktiviteten. Det ble derfor brukt en metode som gir et enkelt og kvantifiserbart celledødsresultat, MTT-assay. Resultater fra fem uavhengige MTT-assay viste at viabiliteten til cellene raskt ble redusert etter at glukose var fjernet fra mediet. Målingene i alle forsøkene ble gjort 1,5-2,5 timer etter at glukosefritt medium var tilsatt i brønnene. Det var stor variasjon fra forsøk til forsøk fordi celletettheten varierte. For at målingene skulle kunne sammenliknes ble alle forsøkene normalisert og ubehandlet ble alltid

satt til 100 % aktivitet. Verdiene for glukosedepriverte celler ble beregnet som prosent av ubehandlet. Ved glukosedepriivering var mitokondrieaktiviteten og viabiliteten redusert med over 40 % sammenliknet med ubehandlede kontrollceller i løpet av tidsperioden 1,5-2,5 timer (figur 3.13).



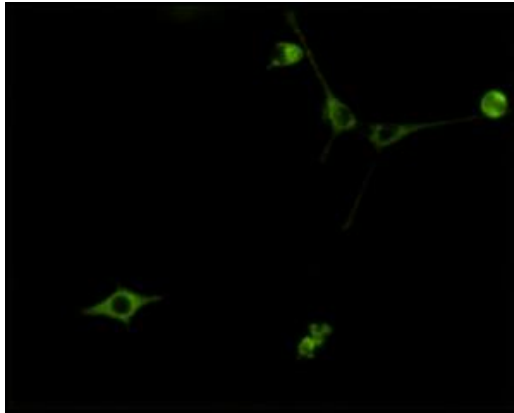
Figur 3.13: MTT-assay viser at viabiliteten til PC12-cellene raskt reduseres. Glukosefritt medium er tilsatt i halvparten av brønnene i et 96-brønnsplate og inkubert med 5 mg/mL MTT-løsning. Krystallene er løst i DMSO og fargereaksjonen avlest i plateleser. Tallene er relative til totalaktiviteten i ubehandlede celler som er satt til 100 %. Aktiviteten ble målt i fem uavhengige forsøk (n= 5). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene er gjengitt som gjennomsnitt med standardfeil (SEM) og finnes i tabell 3.7.

Tabell 3.7: Tall til figur 3.13

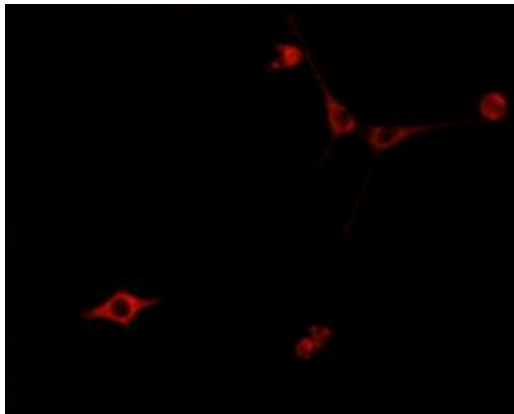
Behandling	Gjennomsnitt	Feilfelt (= SEM)	Antall forsøk (= n)
Ubehandlet	100	0,00	5
Glukosedeprivert	58,3	0,05	5

3.3.3 Morfologi

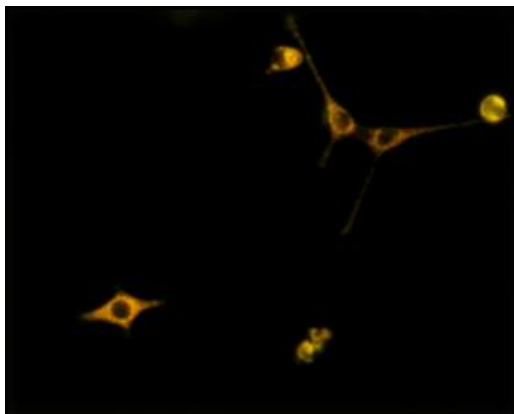
Glukosedepriverte PC12-celler og ubehandlede PC12-celler ble farget opp med MT Green og MT Red. Fordi cellene skulle studeres i mikroskop ble de splittet ut i tynnbunnede IBIDI-skåler. Det ble tatt bilder og distribusjonen ble studert (figur 3.14). Glukosedepriverte celler ble studert etter 30 minutter, 60 minutter, 2 timer og 24 timer. Ubehandlete celler ble også studert på de samme tidspunktene.

A**Ubehandlet:**

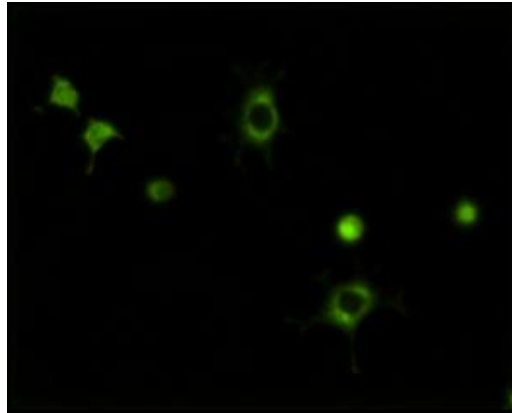
MT Green



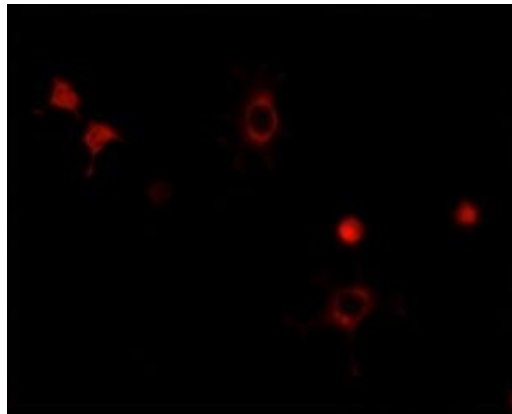
MT Red



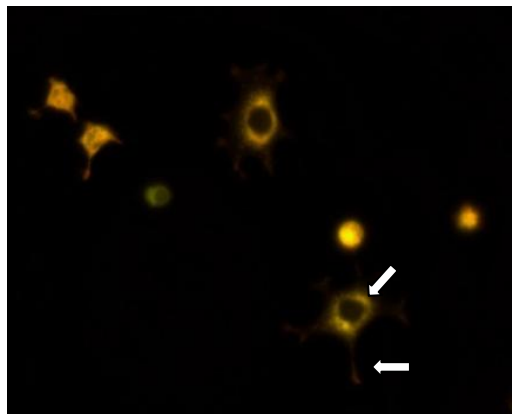
Overlapp

B**24 timers glukosedepriivering:**

MT Green



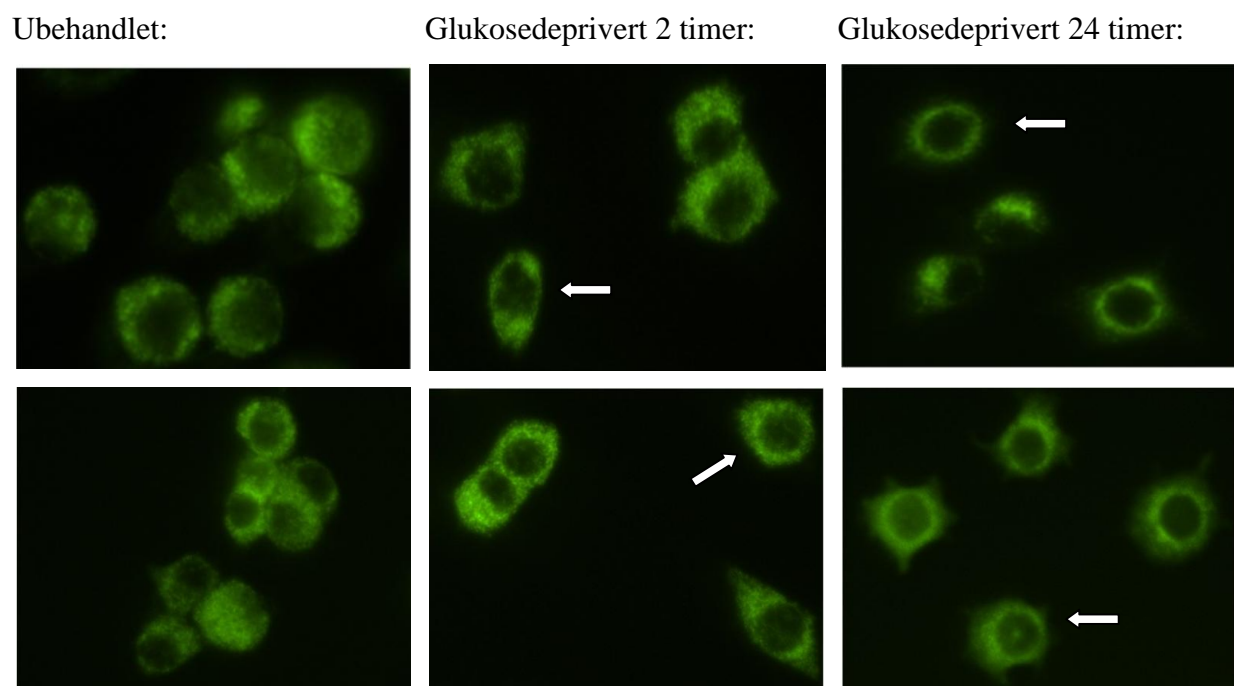
MT Red



Overlapp

Figur 3.14: Bilder av ubehandlede og glukosedepriiverte PC12-celler. PC12-cellene var enten ubehandlet eller glukosedepriivert i 24 timer. De ble farget med MT Green og MT Red og studert i mikroskop. Distribusjonen av MT Green og MT Red er ganske lik etter 24 timer med glukosedepriivering, men noen utløpere har en mer rødaktig farge sammenliknet med fargen rundt kjernene. Pilene indikerer fargeendringene. Bildene ble tatt med Nikon Digital Sight DSQi1MC i mikroskop Nikon Eclipse TE300 med forstørrelse 40X.

Dersom bildene ble lagt over hverandre var det mulig å se på distribusjonen av ROS-produserende mitokondrier mot den generelle distribusjonen av mitokondriene i cellene ved å se på fargen på bildet (figur 3.14). Man får en gul-oransje farge dersom bildene legges over hverandre og distribusjonen er lik. I ubehandlede celler så det ut til at det var en forholdsvis lik distribusjon av fargene (MT Green og MT Red). Når cellene hadde vært i stått 24 timer i glukosefritt medium klumpet mitokondriene seg mer sammen og ble rundere slik at cellene ble oppfattet som mer ”kornete”. Det så også ut til at noen av de ROS-produserende mitokondriene flyttet seg ut i utløperne da fargen i selve cellekroppen var gulaktig, mens fargen i utløperne var mer rød-oransje (figur 3.14). Mitokondriene samlet seg i smale ringer rundt kjernen når de var glukosedeprivert og denne endringen kunne man se antydninger til ganske tidlig. Allerede 2 timer etter at cellene hadde fått glukosefritt medium kunne tendensene til dannelsen av smale ringer observeres (figur 3.15).



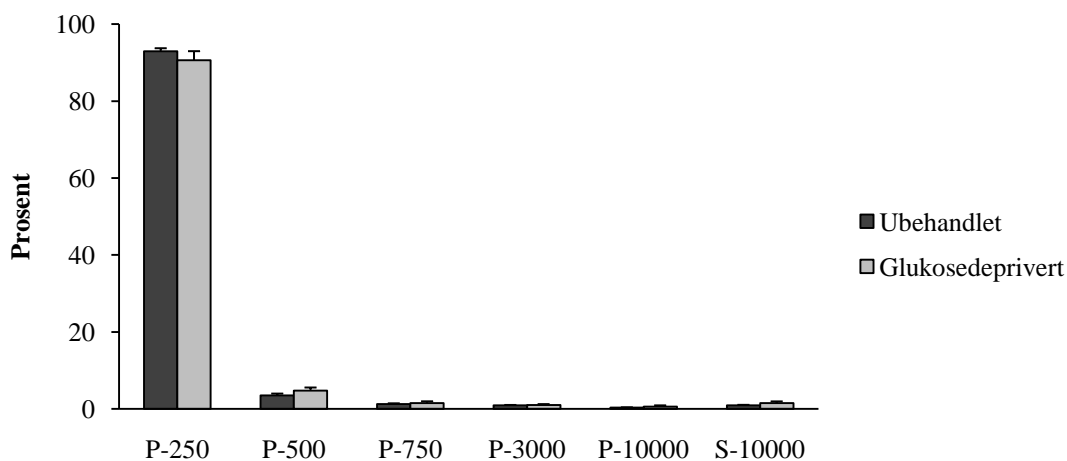
Figur 3.15: Ubehandlete og glukosedepriverte cellers mitokondriemorfologi er forskjellige. PC12-cellene ble glukosedeprivert i to timer og 24 timer. De ble farget med MT Green for å studere mitokondriedistribusjonen og eventuelle endringer i denne. Allerede etter to timer ble det observert en forskjell mellom ubehandlede og glukosedepriverte celler. Etter 24 timer var endringen enda større. Pilene peker på eksempler på endringer i morfologien sammenliknet med ubehandlede celler. Bilder ble tatt med Nikon Digital Sight DSQi1MC i mikroskop Nikon Eclipse TE300 med forstørrelsen 40X.

3.3.4 Fluorescensmåling med MT Green, MT Red, Hoechst og ER-tracker etter 4 timers glukosedepriivering

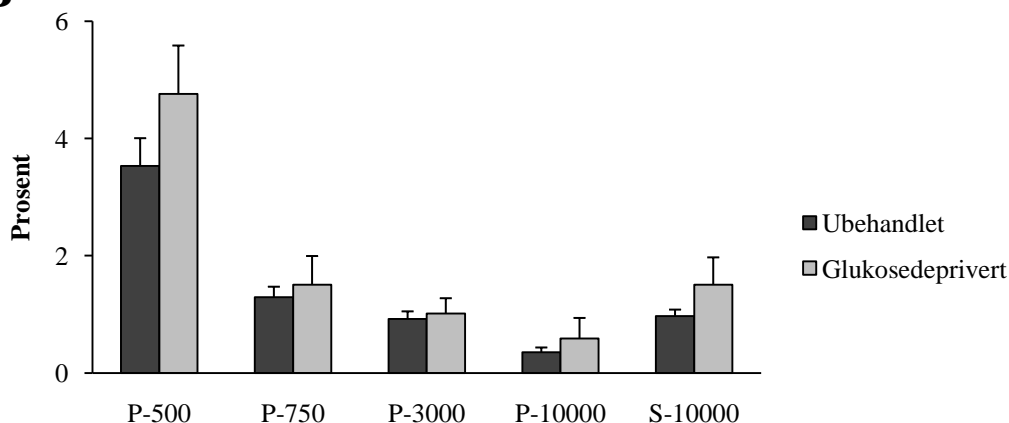
MT Green

Det var ingen signifikante forskjeller mellom ubehandlede og glukosedepriiverte celler som var tilsatt MT Green (figur 3.16). Mitokondriefordelingen var ganske lik i alle fraksjonene uavhengig av om de var glukosedepriiverte eller ubehandlede, men det var en liten tendens til en økning av mitokondrier i de glukosedepriiverte cellene, spesielt i fraksjon P-500, P-10000 og S-10000. Det var mest mitokondrier i den tyngste fraksjonen, P-250.

A- MT Green



B



Figur 3.16: Det er ingen forskjell på fordelingen av mitokondrier i fraksjonene fra ubehandlede og glukosedepriiverte celler. Cellene ble enten glukosedepriivert i 4 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt MT Green, høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav

til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figur A viser fordelingen av MT Green i alle fraksjonene og figur B viser de fem siste fraksjonene med en ny y-akse. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren (n=29). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med t-test og Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.8

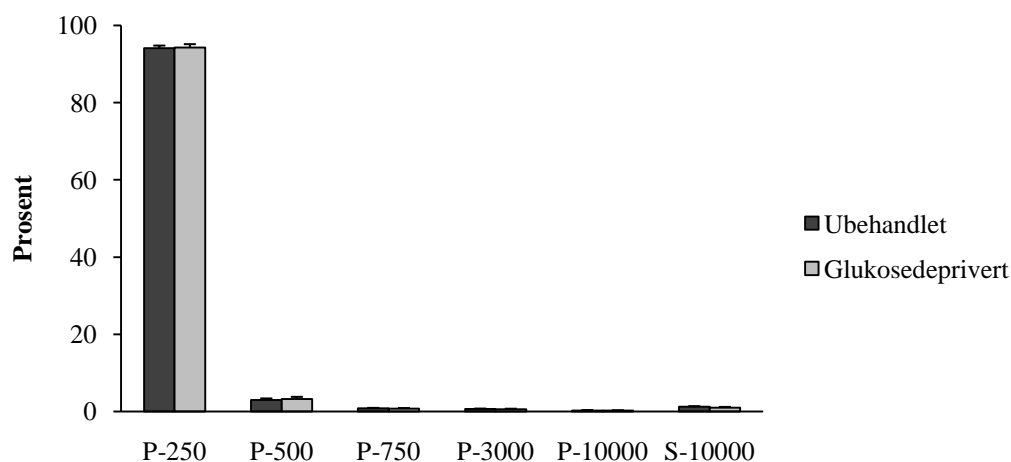
Tabell 3.8: Tall til figur 3.16

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
	P-250	92,9	0,8	29
	P-500	3,5	0,5	29
	P-750	1,3	0,2	29
	P-3000	0,9	0,1	29
	P-10000	0,4	0,1	29
	S-10000	1,0	0,1	29
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	90,6	2,3	29
	P-500	4,8	0,8	29
	P-750	1,5	0,5	29
	P-3000	1,0	0,3	29
	P-10000	0,6	0,4	29
	S-10000	1,5	0,5	29

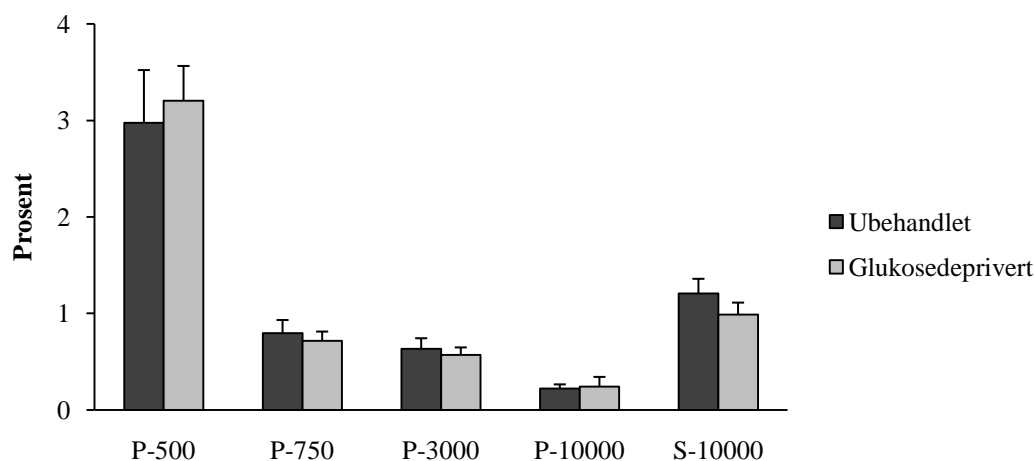
MT Red

Ubehandlete og glukosedepriverte celler som ble tilsatt MT Red hadde ikke forskjellige mitokondriell ROS-produksjon (figur 3.17). Det var en jevn produksjon av ROS i hver fraksjon, uavhengig av om cellene var behandlet eller ikke. Hovedproduksjonen av ROS skjedde i den tyngste fraksjonen, P-250, noe som også var forventet ettersom det var fraksjonen med mest mitokondrier målt med MT Green.

A - MT Red



B



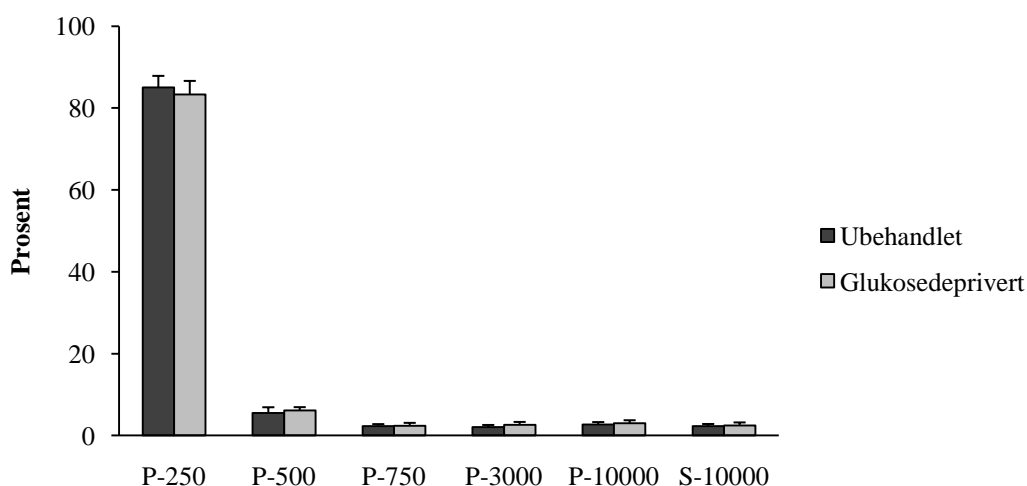
Figur 3.17: Det er ingen forskjell på ROS-produksjonen i fraksjoner fra ubehandlede og glukosedepriverte celler. Cellene ble glukosedeprivert i 4 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt MT Red, høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figur A viser fordelingen av MT Red i alle fraksjonene og figur B viser de fem siste fraksjonene med en ny y-akse. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren (n=27). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med t-test og Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.9.

Tabell 3.9: Tall til figur 3.17

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	P-250	94,2	0,9	27
	P-500	3,0	0,5	27
	P-750	0,8	0,1	27
	P-3000	0,6	0,1	27
	P-10000	0,2	0,0	27
	S-10000	1,2	0,2	27
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	94,3	0,6	27
	P-500	3,2	0,4	27
	P-750	0,7	0,1	27
	P-3000	0,6	0,1	27
	P-10000	0,2	0,1	27
	S-10000	1,0	0,1	27

Hoechst

Kjernene endret ikke distribusjon etter behandling (figur 3.18). Det meste av kjernene var i den tyngste fraksjonen. Det var lite kjerner igjen i de neste fraksjonene og de var ganske jevnt fordelt med omtrent 2,5 % kjerner i hver av de fire siste fraksjonene. Det var ingen forskjell i kerneinnholdet i fraksjonene.



Figur 3.18: Det er ingen forskjell mellom ubehandlede og glukosedepriverte cellers kerneinnhold i fraksjonene. Cellene ble enten glukosedeprivert i 4 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt Hoechst for å måle kerneinnholdet, høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figuren viser fordelingen av Hoechst i alle fraksjonene. * = $p < 0,05$. Statistisk

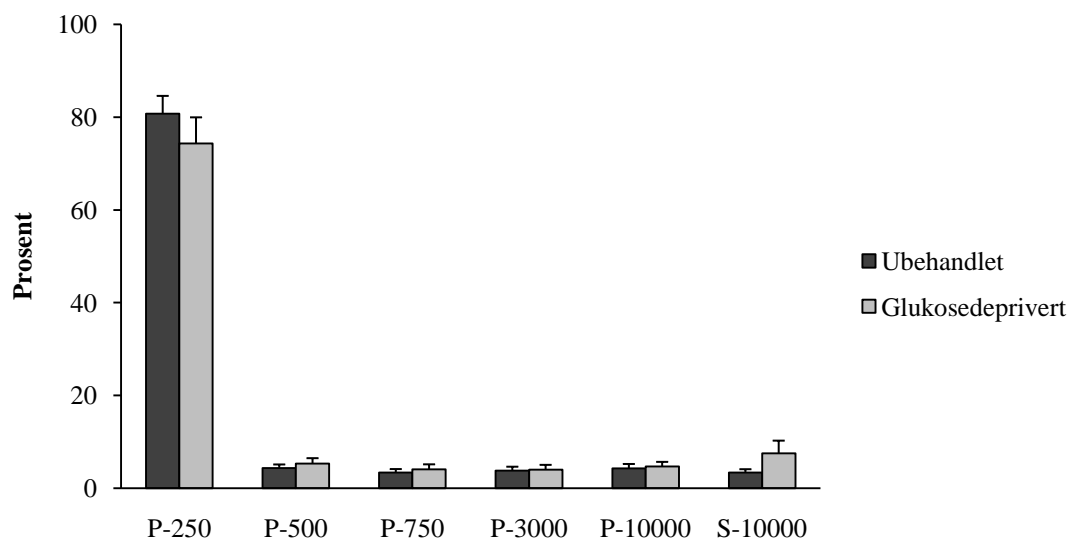
analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren (n=14). Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.10

Tabell 3.10: Tall til figur 3.18

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	P-250	85,0	2,9	14
	P-500	5,5	1,4	14
	P-750	2,3	0,5	14
	P-3000	2,1	0,5	14
	P-10000	2,7	0,6	14
	S-10000	2,3	0,5	14
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	83,3	3,3	14
	P-500	6,1	0,8	14
	P-750	2,4	0,7	14
	P-3000	2,6	0,8	14
	P-10000	3,0	0,7	14
	S-10000	2,5	0,7	14

ER-tracker

Glukosedepriivering av PC12-celler endret ikke fordelingen av ER sammenliknet med ER-fordelingen i ubehandlede celler (figur 3.19). I celler som var tilsatt ER-tracker var det en tendens til noe mindre ER-innhold i den tyngste fraksjonen i glukosedepriverte celler. I de resterende fraksjonene var det omtrent like mye ER i fraksjoner fra glukosedepriverte celler som i fraksjoner fra ubehandlede celler.



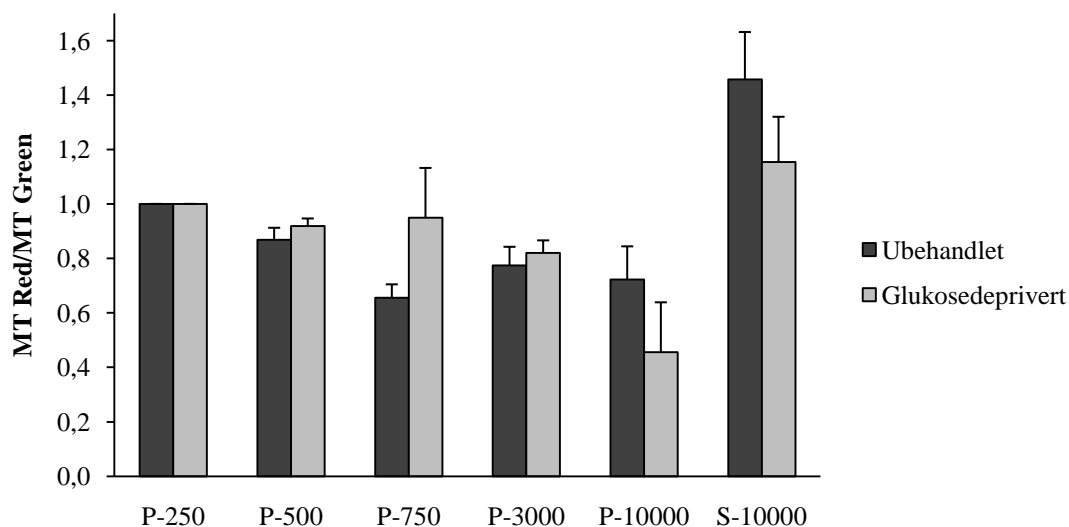
Figur 3.19: Det er ingen forskjell mellom ubehandlede og glukosedepriverte cellers ER-innhold i fraksjonene. Cellene ble enten glukosedeprivert i 4 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt ER-tracker for å måle ER-innhold. Cellene ble høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figuren viser fordelingen av ER-tracker i alle fraksjonene. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren (n=14). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.11.

Tabell 3.11: Tall til figur 3.19

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	P-250	80,7	3,8	14
	P-500	4,4	0,7	14
	P-750	3,4	0,8	14
	P-3000	3,8	0,8	14
	P-10000	4,3	0,9	14
	S-10000	3,4	0,7	14
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	74,4	5,6	14
	P-500	5,3	1,2	14
	P-750	4,1	1,1	14
	P-3000	4,0	1,0	14
	P-10000	4,7	1,0	14
	S-10000	7,5	2,7	14

Forholdstall målt med MT Red og MT Green etter 4 timer

For å se om den mitokondrielle ROS-produksjonen endret seg i løpet av glukosedepriiveringsperioden ble det målt fluorescens ved 4 timer og 24 timer. For å få et bilde på en eventuell endring ble forholdet mellom MT Red og MT Green beregnet. Etter 4 timer var det ingen forskjell mellom ubehandlet og behandlede celler i hver fraksjon og det kan konkluderes med at det ikke var noen forskjell i ROS-produksjonen så tidlig (figur 3.20).



Figur 3.20: Det er ingen forskjell på ROS-produksjonen i ubehandlede og glukosedepriverte celler i fraksjonene etter 4 timer. Cellene ble farget opp med MT Green og MT Red 45 minutter før høsting. De ble høstet 4 timer etter glukosedepriivering, homogenisert og separert på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g). Det ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Disse ble avlest i plateleser og forholdstallene beregnet. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes (n= 13-16 for ubehandlede, n=9-16 for glukosedepriverte). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.12.

Tabell 3.12: Tall til figur 3.20

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (= n)
Ubehandlet	P-250	1,0	0,00	16
	P-500	0,9	0,04	16
	P-750	0,7	0,05	16
	P-3000	0,8	0,07	16
	P-10000	0,7	0,12	13
	S-10000	1,5	0,17	14

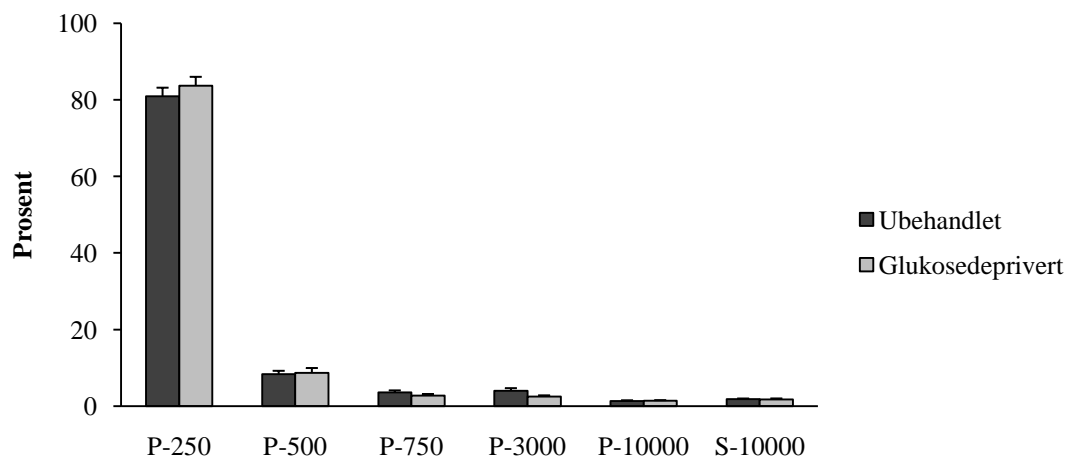
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (= n)
Glukosedeprivert	P-250	1,0	0,00	16
	P-500	0,9	0,03	16
	P-750	1,0	0,18	16
	P-3000	0,8	0,05	15
	P-10000	0,5	0,18	9
	S-10000	1,2	0,17	13

3.3.5 Fluorescensmåling med MT Green, MT Red, Hoechst og ER-tracker etter 24 timers glukosedepriivering

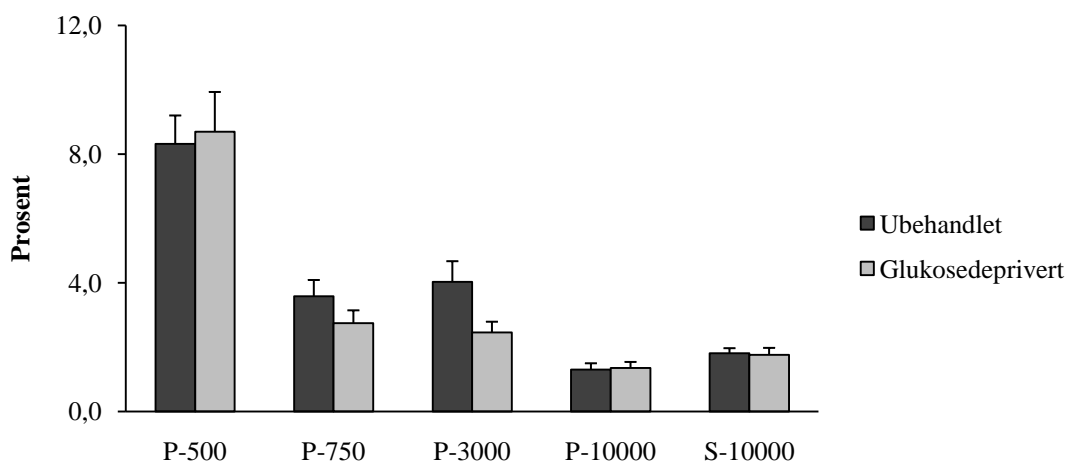
MT Green

Det var ingen forskjeller mellom ubehandlede og glukosedepriverte cellers mitokondriefordeling i fraksjonene (figur 3.21). Fra P-500 var fordelingen mellom fraksjonene ganske lik. Aller mest mitokondrier var det i den tyngste fraksjonen, P-250.

A



B



Figur 3.21: Det er ingen forskjell mellom ubehandlede og glukosedepriverte cellers mitokondriefordeling. Cellene ble enten glukosedeprivert i 24 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt MT Green for å måle mitokondrieinnholdet. Cellene ble høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figur A viser fordelingen av MT Green i alle fraksjonene og figur B viser fraksjonene de fem siste fraksjonene med en ny y-akse. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren (n=20 for ubehandlede, n=24 for glukosedepriverte). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.13.

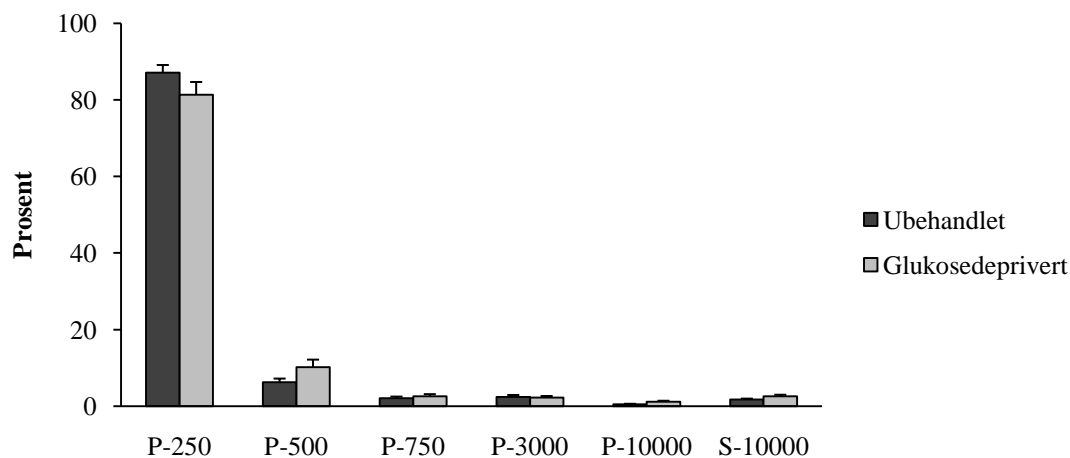
Tabell 3.13: Tall til figur 3.21

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	P-250	83,7	2,3	20
	P-500	8,7	1,2	20
	P-750	2,7	0,4	20
	P-3000	2,5	0,3	20
	P-10000	1,4	0,2	20
	S-10000	1,8	0,2	20
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	81,0	2,2	24
	P-500	8,3	0,9	24
	P-750	3,6	0,5	24
	P-3000	4,0	0,6	24
	P-10000	1,3	0,2	24
	S-10000	1,8	0,2	24

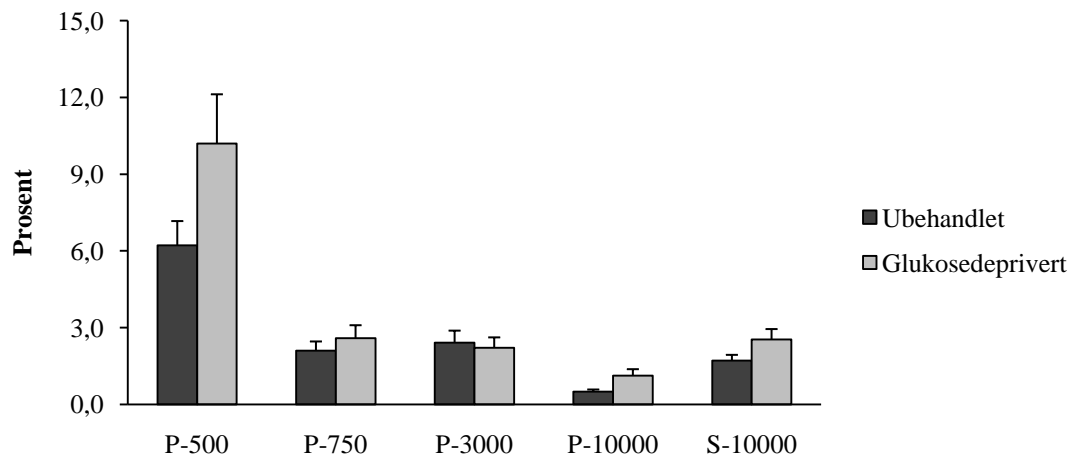
MT Red

Det ble ikke funnet noen forskjeller i innholdet av MT Red i fraksjonene. I fraksjon P-250 var det en tendens til at MT Red-innholdet var noe lavere hos de glukosedepriverte cellene, mens det i fraksjon P-500 ble observert en motsatt tendens (figur 3.22). Den høyeste ROS-produksjonen var i P-250. Fra P-750 var innholdet av MT Red, og dermed også ROS, omtrent likt i alle fraksjonene.

A



B



Figur 3.22: Det er ingen signifikant forskjell mellom ubehandlede og glukosedepriverte cellers ROS-produksjon. Cellene ble enten glukosedeprivert i 24 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt MT Red for å måle ROS-produksjon og høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figur A viser fordelingen av MT Red i alle fraksjonene og figur B viser de fem siste fraksjonene med en ny y-akse. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren

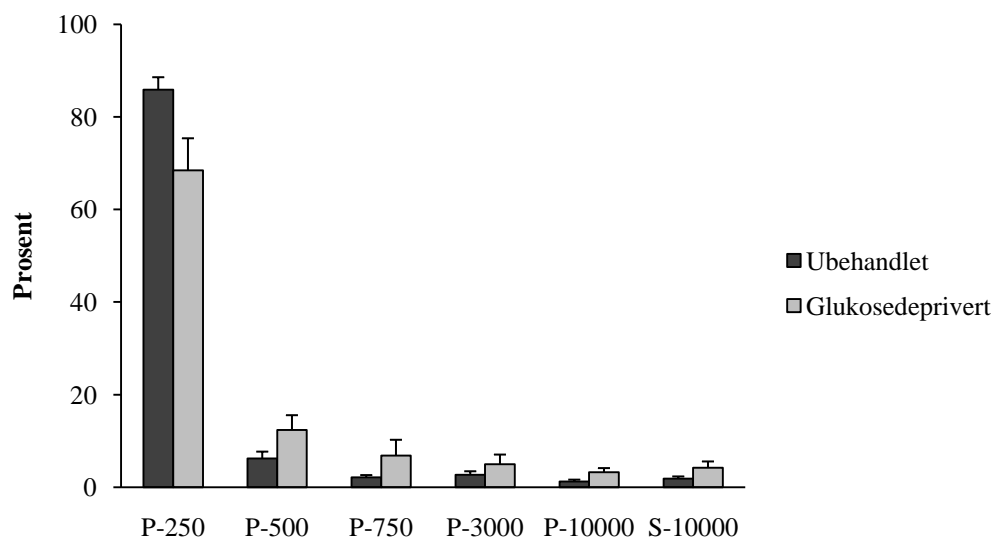
(n=18 for ubehandlete, n=22 for glukosedepriverte). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.14.

Tabell 3.14: Tall til figur 3.22.

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	P-250	87,1	2,0	18
	P-500	6,2	0,9	18
	P-750	2,1	0,4	18
	P-3000	2,4	0,5	18
	P-10000	0,5	0,1	18
	S-10000	1,7	0,2	18
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	81,4	3,3	22
	P-500	10,2	1,9	22
	P-750	2,6	0,5	22
	P-3000	2,2	0,4	22
	P-10000	1,1	0,2	22
	S-10000	2,5	0,4	22

Hoechst

Det var ingen forskjell i kjerneinnholdet i fraksjonene fra ubehandlete og glukosedepriverte celler, men i fraksjon P-250 var det en tendens til en reduksjon i kjerneinnholdet hos de glukosedepriverte cellene sammenliknet med de ubehandlete (figur 3.23). I de fem andre fraksjonene var det et en tendens til et høyere kjerneinnhold i glukosedepriverte celler.



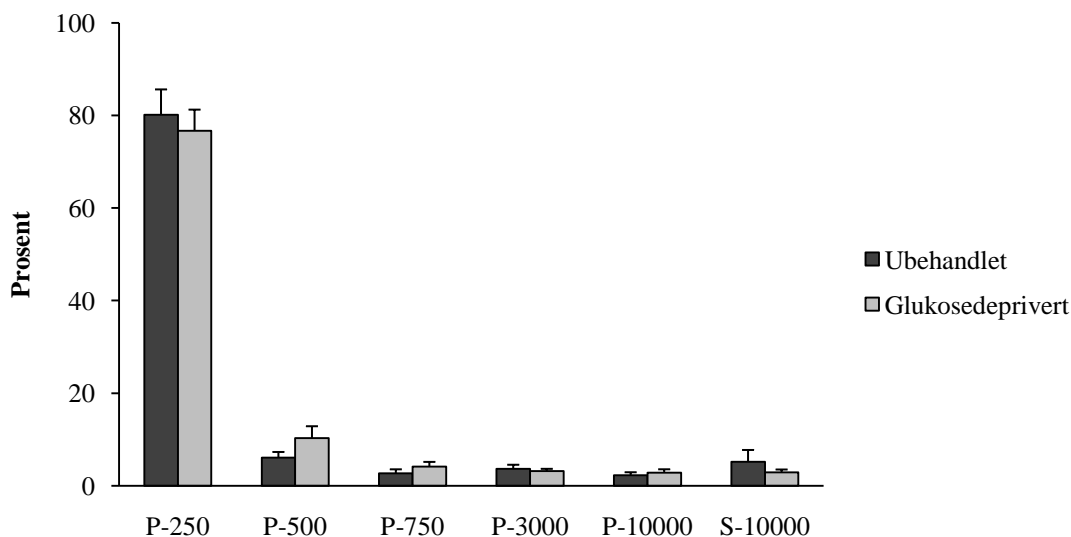
Figur 3.23: Det er ingen forskjell mellom ubehandlede og glukosedepriverte cellers kjerneinnhold. Cellene ble enten glukosedeprivert i 24 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt Hoechst for å måle kjerneinnholdet og høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figuren viser fordelingen av Hoechst i alle fraksjonene. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren (n=10 for ubehandlede, n=12 for glukosedepriverte). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.15.

Tabell 3.15: Tall til figur 3.23

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	P-250	85,9	2,7	10
	P-500	6,2	1,5	10
	P-750	2,1	0,5	10
	P-3000	2,7	0,7	10
	P-10000	1,2	0,4	10
	S-10000	1,8	0,5	10
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	68,5	6,9	12
	P-500	12,4	3,1	12
	P-750	6,8	3,4	12
	P-3000	5,0	2,1	12
	P-10000	3,2	0,9	12
	S-10000	4,2	1,4	12

ER-Tracker

Det var ingen forskjell mellom ubehandlete og glukosedepriverte cellers ER-fordeling i fraksjonene (figur 3.24). I fraksjon P-500 fra glukosedepriverte celler var det en tendens til en økning i forhold til ubehandlete celler i samme fraksjon. Det var mest ER i den tyngste fraksjonen P-250.



Figur 3.24: Det er ingen signifikant forskjell mellom ubehandlete og glukosedepriverte cellers ER-innhold. Cellene ble enten glukosedeprivert i 24 timer eller forble ubehandlet. De ble tilsatt ER-tracker og høstet, homogenisert og separert ved sentrifugering på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g), noe som ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Deretter ble fluorescensen avlest i plateleser. Figuren viser fordelingen av ER-tracker i alle fraksjonene. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes i figuren (n=9 for ubehandlete, n=11 for glukosedepriverte). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.16.

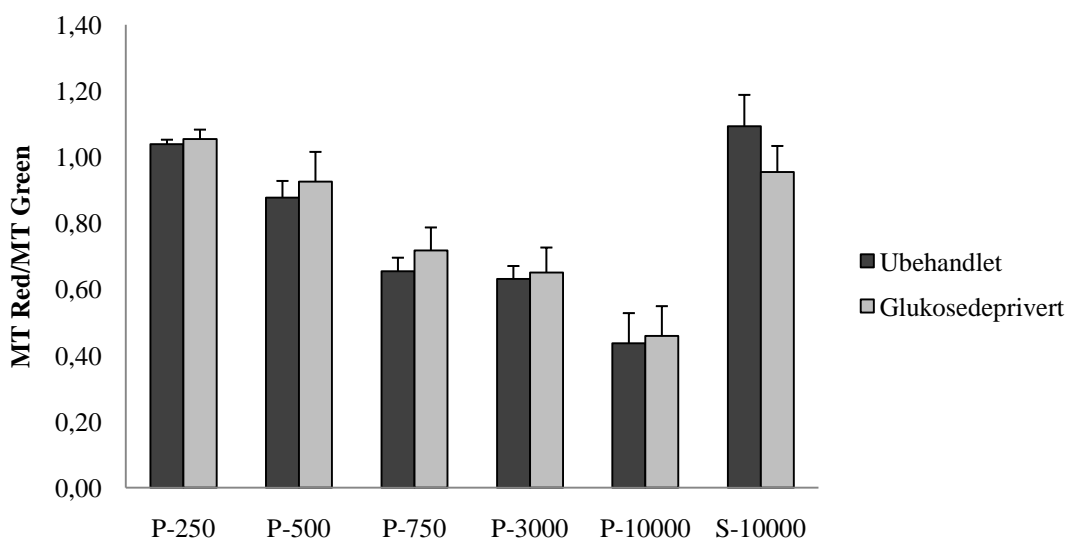
Tabell 3.16: Tall til figur 3.24

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Ubehandlet	P-250	80,1	5,5	9
	P-500	6,1	1,2	9
	P-750	2,7	0,9	9
	P-3000	3,7	0,9	9
	P-10000	2,3	0,7	9
	S-10000	5,1	2,6	9

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt (%)	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (=n)
Glukosedeprivert	P-250	76,7	4,6	11
	P-500	10,3	2,6	11
	P-750	4,2	1,0	11
	P-3000	3,2	0,5	11
	P-10000	2,8	0,7	11
	S-10000	2,9	0,7	11

Forholdstall målt med MT Red og MT Green etter 24 timer

MT Red/MT Green forholdet ble beregnet etter 24 timer. Det var ingen forskjell i fraksjonene fra ubehandlede og glukosedepriverte celler (figur 3.25).



Figur 3.25: Det er ingen forskjell på ROS-produksjonen i de ulike fraksjonene fra ubehandlede og glukosedepriverte celler etter 24 timer. Cellene ble farget opp med MT Green og MT Red 45 minutter før høsting. De ble høstet etter 24 timer, homogenisert og separert på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g). Det ga opphav til fem fraksjoner og én supernatant. Disse ble avlest i plateleser og forholdstallene beregnet. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes (n= 11-13 for ubehandlede, n=11-13 for glukosedepriverte). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med t-test og Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.17.

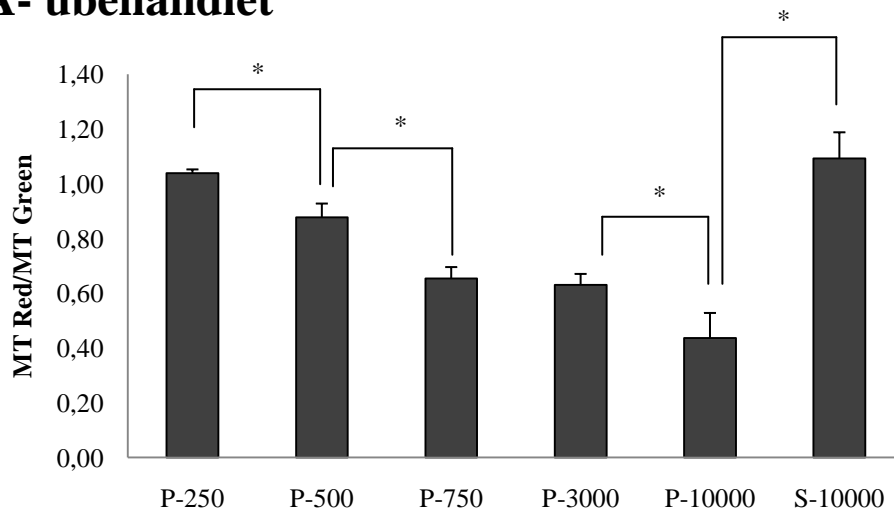
Tabell 3.17: Tall til figur 3.25 og 3.26

Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (= n)
Ubehandlet	P-250	1,04	0,01	13
	P-500	0,88	0,05	13
	P-750	0,65	0,04	13
	P-3000	0,63	0,04	13
	P-10000	0,44	0,09	11
	S-10000	1,09	0,1	13

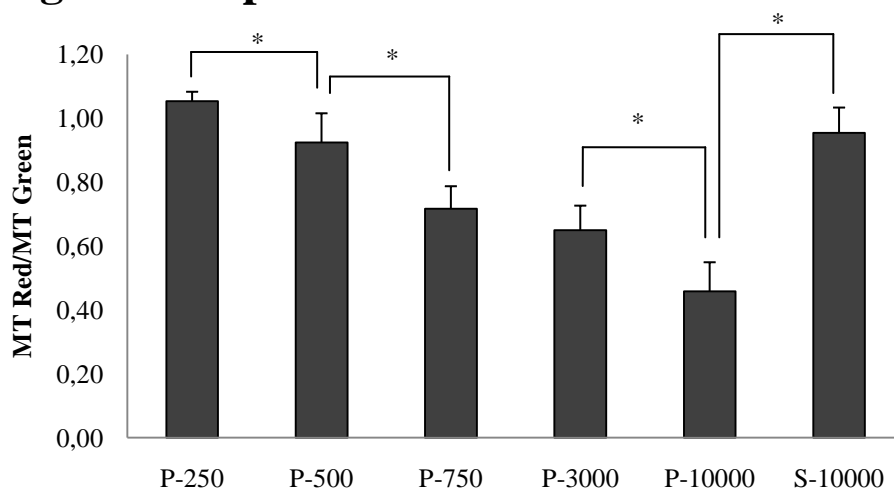
Behandling	Fraksjon	Gjennomsnitt	Feilfelt (= SEM)	Antall paralleller (= n)
Glukosedeprivert	P-250	1,05	0,03	13
	P-500	0,93	0,09	12
	P-750	0,72	0,07	12
	P-3000	0,65	0,08	12
	P-10000	0,46	0,09	12
	S-10000	0,95	0,08	11

Når forholdet mellom MT Red og MT Green ble målt ga det en reduksjon fra fraksjon til fraksjon både i ubehandlede og glukosedepriverte celler, med unntak av P-3000 (figur 3.26). ROS-produksjonen var synkende fra P-250 til P-750, men i supernatanten var det en økning i ROS-produksjonen sammenliknet P-10000.

A- ubehandlet



B- glukosedeprivert



Figur 3.26: Nedgangen i ROS-produksjonen etter 24 timer er signifikant i både ubehandlede og glukosedepriverte celler. Cellene ble farget opp med MT Green og MT Red 45 minutter før høsting, høstet etter 24 timer, homogenisert og separert på fem hastigheter (250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g). Det ga opphav til seks fraksjoner (P= pellet. S= supernatant). Disse ble avlest i plateleser og forholdstallene beregnet. Figur A viser fraksjoner fra ubehandlede celler og figur B viser fraksjoner fra glukosedepriverte celler. Gjennomsnitt med standardfeil (SEM) benyttes (n= 11-13 for ubehandlede, n=11-13 for glukosedepriverte). * = $p < 0,05$. Statistisk analyse er gjort med t-test og Mann-Whitney Rank Sum Test. Tallene figuren er basert på finnes i tabell 3.17.

4 Diskusjon

4.1 Diskusjon av metoder

4.1.1 *In vitro*-modeller

Kornceller

Korncellekulturer er en *in vitro*-modell som brukes for å studere effekter av ulike substanser, for eksempel glutamat, på nevroner og eksitotoksisitet. Primærkulturene er egnet til å undersøke ulike organellepopulasjoner, som mitokondrier, og deres ulike egenskaper (Pysh and Khan 1972). Kornceller fra rotte, mus og kylling kan benyttes som *in vitro*-modeller (Seil and Herndon 1970; Privat, Marson et al. 1979; Jacobs, Aden et al. 2006). I denne oppgaven har ubehandlede og glutamateksponerte korncellers mitokondrier blitt undersøkt for å se om fordelingsmønsteret endret seg. Fordelen med å bruke kornceller til slike formål, i forhold til for eksempel PC12-celler, er at cellene kommer fra levende forsøksdyr. Det gjør det lettere å knytte observasjoner gjort i primærkulturene til nevroner *in vivo*. Når kornceller benyttes i studier kan resultatene fra ulike forsøk variere noe fordi opphavet er ulikt.

Kyllingkornceller er en alternativ *in vitro*-modell til rottekorncellene.

Kyllingkorncellemodellen ble utviklet ved Farmasøytisk Institutt i 2006. Korncellekulturer fra kylling likner korncellekulturer fra rotter, men innholdet av nevroner er noe lavere.

Immunfarging med nevronmarkøren NeuN har vist at nevroninnholdet i kulturene er på 80 % mot mellom 80-90 % i rottekulturer (Gallo, Ciotti et al. 1982; Prinetti, Chigorno et al. 2000).

Kyllingkorncellene utviklet glutamateksitotoksisitet slik som rottekornceller målt ved ROS-produksjon og caspase 3 aktivering (Jacobs, Aden et al. 2006). Rottekornceller er avhengig av depolariserende forhold for å ha en normal utvikling (Gallo, Kingsbury et al. 1987). I tillegg kreves det dyrestallfasiliteter. Kyllingkornceller kan dyrkes under fysiologiske forhold og det kreves ikke dyrestall. For at kyllingkorncellene skal kunne dyrkes i ikke-depolariserende forhold må det benyttes kyllingserum (Jacobs, Aden et al. 2006). Kyllingserumet kan inneholde ulike komponenter som bidrar til at depolariserende forhold ikke er nødvendig. I dag dyrkes kyllingkorncellene på laboratoriet i definert medium under depolariserende forhold uten kyllingserum. De serumfrie betingelsene kan bidra til å redusere variasjonen i

resultatene. I denne oppgaven var det i de fleste tilfeller liten forskjell i variasjonen mellom cellekulturene og cellelinjen.

PC12-celler

PC12-celler er en cellelinje som stammer fra et feokromocytom fra binyrene hos rotter. Disse cellene er mer homogene enn kornceller fordi de har samme opprinnelse, og det gjør dem til en verdifull *in vitro*-modell for å studere nevrobiologiske problemstillinger som differensiering, proliferering og celledød. Resultatene som oppnås vil også være mer reproduserbare nettopp fordi opphavet er likt (Greene and Tischler 1976). Resultater fra celler som ble splittet ut samtidig hadde veldig liten spredning og rensetrinnene i separasjonsmetoden ga et jevnere tap av organeller fra forsøk til forsøk med PC12-celler sammenliknet med kornceller.

Dersom PC12-celler dyrkes i nærvær av NGF vil de få uløpere og de vil likne sympatiske nevroner. I denne oppgaven er det gjort forsøk med udifferensierte celler, men det vil også kunne være interessant å studere PC12-celler behandlet med NGF for å se om mitokondriene flytter seg ut i utløperne og om egenskapene da blir annerledes. PC12-celler kan også syntetisere og frigjøre katekolaminer. Cellenes morfologi, vekstegenskaper og NGF-følsomhet ser ikke ut til å endre seg over tid. Fordi PC12-cellelinjen er en kreftcellelinje kan cellene ha egenskaper som ikke finnes hos normale celler (Greene and Tischler 1976).

4.1.2 Separasjonsmetoden

Separasjonsmetoden brukt i oppgaven ble utviklet under arbeidet med en tidligere masteroppgave (Austdal 2009). Dette arbeidet tok utgangspunkt i tidligere resultater fra forskningsgruppen, som viste at dersom man eksponerte rottekornceller for glutamat, så kunne man ved hjelp av mikroskopi se at det ga en ulik ROS-produksjon i ulike mitokondriepopulasjoner (Mathisen, Thorkildsen et al. 2007). I arbeidet til Austdal ble det etablert en separasjonsmetode som separerer organeller basert på tetthet og denne metoden var utgangspunktet for all separeringen gjort i denne oppgaven.

Å separere mitokondrier for å studere subpopulasjoner har blitt gjort i mange år. Metoden har utviklet seg fra sentrifugeringsmetoder som først ble tatt i bruk i celler fra lever. Den gangen opparbeidet man fraksjoner hvor det senere ble målt proteiner og enzymer, knyttet til

forskjellige organeller, for å bestemme innholdet av disse. Det var da hovedsakelig mitokondrier, kjerner og mikrosomer som ble separert og analysert. I dag brukes metoden i mange forskjellige vev og celletyper som for eksempel nevronkulturer (Bjorntorp, Bjorkerud et al. 1965; Farooq and Norton 1978; Wilkin, Reijnierse et al. 1979; Sims 1990). Metoden som har blitt benyttet i denne oppgaven gir fraksjoner som inneholder mitokondrier (Austdal 2009). Men det var ikke kjent hvor mye andre organeller fraksjonene inneholdt. Det ble derfor brukt trackere for å farge opp mitokondrier, kjerner og ER for å studere organellefordelingen ved hjelp av fluorescensavlesning samt antistoffer mot HSP-60 og Lamin A/C for å studere fordelingen ved hjelp av Westernanalyse. Å ha denne informasjon om organelleinnholdet i fraksjonene er viktig for å vite hva man analyserer og om eventuelle effekter man finner kan tilskrives én eller flere organeller.

Alle celletypene ble i utgangspunktet separert på 750g, 3000g, 6000g og 10000g. Resultatene fra tidlige forsøk i PC12-celler, gjort i forbindelse med denne oppgaven, tydet på at det ikke bare var et høyt kjerneinnhold i den tyngste fraksjonen P-250, men også et høyt mitokondrieinnhold. Det ble besluttet at det skulle benyttes andre hastigheter for å se om kjernene og mitokondriene da ble skilt fra hverandre. Det ble forsøkt med ulike sentrifugeringshastigheter og tider. Ut i fra disse resultatene ble de optimale hastighetene og tidene bestemt. For PC12-cellene og kyllingkorncellene innebar det at det ble lagt til to sentrifugeringstrinn før 750g, som tidligere var det første sentrifugeringstrinnet, 250g og 500g. I rottekornceller ble de opprinnelige sentrifugeringshastighetene beholdt for å ha muligheten til å knytte resultatene til tidligere funn. For kyllingkornceller ble sentrifugeringshastighetene 250g, 500g, 750g, 3000g, 6000g og 10000g brukt. I PC12-cellene var det lite mitokondrier igjen i de siste fraksjonene. Derfor ble fraksjonene P-6000 og P-10000 slått sammen slik at de endelige sentrifugeringshastighetene ble 250g, 500g, 750g, 3000g og 10000g. De aller fleste sentrifugeringsprotokoller benytter seg av hastigheter som ligger høyere enn 250g. Det er vanlig å begynne på hastigheter mellom 700g og 1000g avhengig av hva slags vev og celler som skal fraksjoneres (Graham 2001a; Graham 2001c). Ved sentrifugering på lave hastigheter vil kjerner og hele celler separeres fra prøvene. For å ivareta prøvene brukes det kjølige sentrifuger (Castle 1998). Flere av de eldre protokollene begynte på 950g for å separere mitokondrier, synaptosomer og myelin (Hamberger, Blomstrand et al. 1970; Wilkin, Reijnierse et al. 1979). I cellene benyttet i denne oppgaven viste det seg at enda lavere hastigheter var gunstig for å opparbeide fraksjoner. Fordelen med metoden som ble brukt i denne oppgaven er at den er enkel og lite tidkrevende. Fordi

prosedyren er rask vil det redusere sannsynligheten for at de biologiske egenskapene til organellene endrer seg.

4.1.3 Analyse av fraksjonene

For å analysere fraksjonene ble det benyttet to ulike metoder: fluorescensavlesning av ulike trackere og Westernanalyse. De ulike trackerne ble studert i mikroskopet for å se på distribusjonen. Dataarket fra produsenten av ER-trackeren gir ingen informasjon om virkningsmekanismen. Det er heller ikke funnet informasjon i litteratursøk foretatt i forbindelse med denne oppgaven. MT Green vil lokaliseres i mitokondrier ved å binde seg til tiol-grupper i mitokondrienes proteiner. MT Green vil akkumulere i mitokondriene uavhengig av membranpotensialet og cellene kan farges etter fiksering (Presley, Fuller et al. 2003; Brustovetsky, Li et al. 2009). Dette gjør den til en viktig tracker for bestemmelse av mitokondriell masse. Samtidig kan MT Green lekke ut av mitokondriene og ut i cytosol slik at kvantitative analyser bør gjøres med forsiktighet (Brustovetsky, Li et al. 2009). MT Green er ikke fluorescerende i vandige løsninger, men fluorescerer på grunn av lipidinnholdet i mitokondriene (Agnello, Morici et al. 2008). Hoechst bindes hovedsakelig til A-T baser i DNA, men kan også, i noe mindre grad, bindes til G-C baser. Fluorescens avgis når Hoechst bindes til områder i dobbelttrådet DNA med tre eller flere A-T basepar (Weisblum and Haenssler 1974; Arndt-Jovin and Jovin 1977). Mitokondriene har sitt eget DNA, mtDNA, og det åpner for at Hoechst kan binde til mtDNA, som er tilstede i alle fraksjonene, og ikke bare nDNA. Dersom det er tilfelle kan det innebære at fluorescensavlesningene av Hoechst ikke vil bli null hvis det er mitokondrier i alle fraksjonene. Dette styrker bruken av Westernanalyse fremfor fluorescensavlesning når kjerneinnholdet skal bestemmes.

Det har blitt vist at alderen til mitokondrier påvirker dannelsen av ROS. I mitokondrier fra nevroner er den basale ROS-produksjonen høyere for eldre mitokondrier sammenliknet med yngre, spesielt for mitokondrier som er lokalisert i dendritter og aksoner. Det er også en aldersrelatert depolarisering av membraner i hvilende mitokondrier, både i de kjernenære og de perifere, som fører til at eldre mitokondrier har et lavere membranpotensial enn yngre. Fordi eldre mitokondrier har et lavere membranpotensial, vil nevronene som inneholder disse mitokondriene ha et dårligere utgangspunkt når de utsettes for stress, for eksempel i form av glutamatbehandling, slik at skaden som oppstår blir større (Parihar and Brewer 2007). MT Red har blitt brukt for å studere den mitokondrielle ROS-produksjonen i cellene. Denne

trackeren er avhengig av membranpotensialet for at den skal tas opp og fordi den er positivt ladet vil den raskt bli tatt opp i de negative mitokondriene (Buckman, Hernandez et al. 2001). Den fluorescerer ikke i sin reduserte tilstand, men når den oksideres vil den avgi fluorescens (Shanker, Aschner et al. 2004). Fordi denne trackeren er avhengig av membranpotensialet for å bli tatt opp kan mitokondrienes alder være av betydning slik at yngre mitokondrier farges bedre fordi de har et normalt membranpotensial.

Mitokondrier fisjonerer og fusjonerer i en dynamisk prosess og homogeniseringen av prøvene kan i seg selv bidra til at mitokondriene fragmenteres. Når homogeniseringen endres fra 20 ganger til 50 ganger øker det risikoen for mitokondriefragmentering. Det kan være med på å påvirke fraksjoneringsmønsteret i de ulike celletypene. Rensetrinnene i metoden vil føre til et tap av cellulære komponenter. I kylling var det stor variasjon mellom forsøkene på hvor mange prosent av mitokondriene, kjernene og ER som forsvant i rensetrinnene. I PC12-cellene var tapet av ulike orgnaller noe jevnere. Før prosedyren ble endret, fra å homogenisere 20 ganger til 50 ganger, lå gjennomsnittet i både kyllingkornceller og PC12-celler på omtrent 20 % mitokondrietap, 20-25 % kjernetap og 30 % ER-tap. Etter at prosedyren ble endret lå tilsvarende tall på ca 15 % mitokondrietap, 15 % kjernetap og 30 % ER-tap i både PC12-cellene og kyllingkorncellene. Det kan være tenkelig at det er en spesiell subpopulasjon av organellene som forsvinner i rensetrinnene. Det er også mulig at noe av fargeløsningene kan befinne seg i cytosol slik at de ikke har rukket og farge opp organellene. Da vil fluorescensavlesningen som gjøres i supernatantene fra de to rensetrinnene, ikke representere det reelle organelletapet. Er det ønskelig å begrense tapet ytterligere kan man spinne med en høyere kraft, men da trenger man en kraftigere sentrifuge som kan spinne på mer enn 10000g. Man kan også prøve med noe lengre inkubasjonstid for å sikre at trackerene akkumuleres i organellene.

HSP-60 ble brukt for å analysere mitokondrieinnhold i de opparbeidete fraksjonene. HSP-60 er et protein som det finnes mye av i mitokondrienes matriks og kan derfor brukes som mitokondriemarkør. Studier har derimot vist at HSP-60 ikke bare finnes i mitokondriene, men også i cytosol. HSP-60 alene kan derfor være en noe uspesifikk mitokondriemarkør (Cheng, Hartl et al. 1990; Itoh, Komatsuda et al. 2002). HSP-60 ble brukt i PC12-celler og i kornceller fra kylling og rotte for å bestemme mitokondrieinnholdet. Mitokondrieinnholdet målt med HSP-60 ble også sammenliknet med målingene gjort med MT Green for å se om en metode var å foretrekke fremfor en annen. Det ser ut til at det er viktig å ha to ulike metoder man kan

benytte fordi en metode alene ikke vil gi et klart svar på innholdet av mitokondrier. Cardiolipin er et fosfolipid som hovedsakelig finnes i den indre membranen i mitokondriene og som ofte brukes som en mitokondriemarkør. Det vil være mulig å undersøke denne markøren i fraksjonene i fremtiden fordi det finnes trackere på markedet som bindes til cardiolipin, kalt NAO (10N-nonyl acridine orange). Men en slik tracker kan ikke benyttes i kvantitative analyser fordi opptaket er avhengig membranpotensialet og hvordan fosfolipidene er ordnet i mitokondriene (Garcia Fernandez, Ceccarelli et al. 2004; Kim, Minkler et al. 2011).

Laminer er membrankomponenter som finnes i kjernene i celler og kan brukes som en kjernemarkør (Gruenbaum, Wilson et al. 2000). Lamin A/C ble brukt i alle celletypene for å vurdere kjerneinnholdet og for å se om det var forskjell på de to måle metodene. Det var forventet at det meste av kjernene skulle være i den tyngste fraksjonen. Derfor ble forholdet mellom HSP-60 og Lamin A/C beregnet slik at det var mulig å se hvilken fraksjon som var mest anriket. Selv om fraksjonene viste seg å inneholde en blanding av organeller så vil ikke dette nødvendigvis utgjøre et problem. Skal man for eksempel undersøke cytokrom c, vil ikke innholdet av kjerner i fraksjonene spille noen rolle fordi cytokrom c er et mitokondrielt protein, som frigjøres ut i cytosol ved apoptose, og som ikke finnes i kjernene. Om det er AIF som skal undersøkes vil kjerneinnholdet ha en større betydning fordi AIF vil translokere til kjernen under apoptose (Daugas, Susin et al. 2000). Mitokondrienes innhold av Bcl-2 kan være interessant å undersøke fordi Bcl-2 er involvert i celledød, men Bcl-2 finnes også i ER (Willis, Day et al. 2003). Dersom det skal gjøres studier på fraksjonene er det viktig å være klar over at ER også kan påvirke resultatene. Man kunne for eksempel benyttet immunfarging i tillegg.

Antistoffet mot APE-1 ble brukt i glutamateksponerte rottekornceller for å undersøke tilstedeværelsen av dette reparasjonsenzymet i fraksjonene. APE-1 aktiviteten vil oppreguleres når DNA-skader skal repareres. ER forventes ikke å påvirke disse resultatene fordi APE-1 er et nukleært og mitokondrielt enzym (Yang, Tadokoro et al. 2010).

4.1.4 Farging med trypanblå

Som metode for å kvantifisere celledøden i PC12-celler ble cellene farget med trypanblå. Trypanblåfarging er en enkel måte å bestemme celledøden på, men kan være tidkrevende

ettersom tellingen skjer manuelt. Cellene telles i mikroskop og døde celler observeres som blå celler (Aras, Hartnett et al. 2008). Det er også mulig å se om en celle er død som følge av apoptose eller nekrose. En apoptotisk celle vil være liten og rund mens en nekrotisk celle ofte sveller og observeres som større. Men dette må verifiseres ved hjelp av andre metoder.

Metoden baserer seg på cellenes membranpermeabilitet og cellemorfologi. For at cellene skal farges må membranen være permeabel. Trypanblåfarge er en hydrofil fargeløsning og dersom membranen er intakt vil ikke fargen trenge gjennom og cellene forblir ufarget. Membranen til en død celle vil ikke være intakt og fargen vil trenge inn i cellen. I celler som er på et tidlig apoptotisk stadium vil membranen fortsatt være intakt og de forblir ufarget. Disse cellene vil oppfattes som levende og kan bidra til at celledødsestimatet blir ukorrekt. I tillegg vil telleprosessen kunne være en feilkilde i seg selv fordi den er subjektiv. Dersom man forventer at celledøden skal være høy vil man kanskje ubevisst telle flere døde celler enn det egentlig er (Aras, Hartnett et al. 2008). Celler kan løsne fra underlaget noe som vil bidra til at celledødsestimatet kan bli et underestimat fordi disse ikke telles. I skåler som hadde blitt glukosedeprivert i 24 timer ble det observert mange løse celler. Disse cellene var døde fordi de var farget blå. Celledøden ble funnet til å være 17 % i glukosedepriverte celler som ikke var løsnet. Men PC12-celler kan løsne fra underlaget selv om de ikke er døde. I en tidligere masteroppgave ble det sett at PC12-celler behandlet med PAC-1 løsnet fra underlaget selv om de ikke var døde. Celledøden blant de løsnete cellene var omtrent lik som det den var for celler som ikke hadde løsnet (Moe 2010).

4.1.5 MTT-assay

MTT-assay brukes for å bestemme viabiliteten til celler ved å måle mitokondrieaktiviteten. Assayet måler cellenes evne til å gjøre om gult MTT-salt til lilla MTT-formazan. Da måles mitokondrienes dehydrogenaseaktivitet i form av absorbansavlesning i plateleser. MTT kan kun kløyves av aktive mitokondrier i levende celler og assayet kan brukes for å undersøke mitokondrieaktiviteten i celler som utsettes for stress. Metoden er ikke avhengig av manuell telling, men gir i stedet en objektiv observasjon av cellene (Mosmann 1983). En begrensning ved bruk av MTT-assay er at formazan kan være toksisk for PC12-celler og dermed gi celledød (Hertel, Hauser et al. 1996). Cellenes viabilitet etter glukosedepriivering kan derfor være høyere enn det den avleste absorbansen tilsier. I denne oppgaven har MTT-assay blitt brukt for å studere glukosedepriverte PC12-celler. PC12-celler deler seg kontinuerlig og

dersom ubehandlede celler blir stående vil de fortsette å dele seg. Forskjellen mellom ubehandlede og behandlede celler kan da virke større enn det den egentlig er. I glukosedepriveringsforsøkene var ikke dette et problem fordi cellene kun hadde stått 1,5-2,5 timer fra de ble glukosedeprivert til avlesningen ble foretatt.

Celledøden målt med trypanblåfarging lå på 17 % mens med MTT-assay ble celledøden målt til å ligge på 40 %. MTT-assayet er avhengig av aktive enzymer for at fargereaksjonen skal finne sted og resultatene fra assayet kan være med på å styrke teorien om at glukosedepriivering fører til en ROS-avhengig celledød. ROS-produksjon vil føre til tap av membranpotensialet og MTT vil ikke bli tatt opp i mitokondriene dersom de har mistet membranpotensialet sitt. Fordi glukosedepriivering kan føre til løse celler som ikke telles ved bruk av trypanblå, så er dette celledødstallet noe lavere enn den reelle celledøden og MTT-assayet kan gi viktig tilleggsinformasjon.

4.2 Diskusjon av resultater

4.2.1 Innhold av organeller i fraksjonene

Separasjonsmetoden ble utviklet for å skille mitokondriepopulasjoner på tetthet. Tidligere har mitokondriefordelingen i kornceller fra rotte og kylling blitt undersøkt. I begge artene ble det da funnet mest mitokondrier i P-750 og P-3000, de tyngste fraksjonene, hvor P-3000 hadde det høyeste innholdet av mitokondrier (Austdal 2009).

I rottekorncellene var det forskjell på innholdet av mitokondrier og kjerner i alle fraksjonene med unntak av P-10000. Fordelingen av mitokondrier i de ulike fraksjonene var noe ulik den som har blitt funnet tidligere. Denne forskjellen kan ha flere årsaker, for eksempel variasjoner i dyrene korncellene kommer i fra eller selve separasjonsmetoden. Fraksjoner fra ubehandlede rottekornceller, hvor organelleinnholdet har blitt undersøkt, har ikke blitt analysert med Westernanalyse i denne oppgaven. Ubehandlete rottekorncellefraksjoner har tidligere blitt analysert med HSP-60. Resultatene viste da at P-3000 hadde høyest innhold av HSP-60, tett etterfulgt av P-750 (Austdal 2009). Kjerneinnholdet har ikke vært analysert med Westernanalyse tidligere og bør undersøkes nærmere.

Tidligere studier av kyllingkornceller har vist at det høyeste innholdet av mitokondrier, målt med fluorescensavlesning av MT Green, var i de tyngste fraksjonene (P-750 og P-3000) (Austdal 2009). I kyllingkorncellene undersøkt i denne oppgaven kom det mest mitokondrier og kjerner ut i P-250, den tyngste fraksjonen. I P-10000 var innholdet av kjerner og ER høyere enn mitokondrieinnholdet. I PC12-celler var fraksjon P-500 den fraksjonen som var mest anriket på mitokondrier i forhold til kjerner og ER. I P-10000 og S-10000 var innholdet av mitokondrier og kjerner lavt, mens ER-innholdet var høyt.

ER finnes i alle fraksjonene i kyllingkornceller og PC12-celler. Det er foreløpig uvisst hva det skyldes. Det kan være at trackeren lekker ut i cellen eller at ER finnes i tettheter eller populasjoner som fordeles i alle fraksjonene. Det vil være interessant å undersøke om disse populasjonenes egenskaper er ulike ved, for eksempel, å se om innholdet av ulike ER-spesifikke proteiner varierer. Å undersøke fraksjonene med Westernanalyse og ER-antistoff vil være viktig videre. Det kan for eksempel benyttes antistoff mot ER-proteiner som calnexin eller calreticulin. Calnexin og calreticulin er en del av "kvalitetssikringssystemet" i ER og binder seg til proteiner som er foldet feil og hindrer videre proteintransport ut av ER (Bergeron, Brenner et al. 1994; Sandhu, Duus et al. 2007). Det finnes andre ER-trackere på markedet som kan brukes, noe som kan være aktuelt å teste ut senere.

I PC12-celler og kyllingkornceller var det forskjeller i innholdet av organeller i fraksjonene hvis man sammenlikner de to analysemetodene, fluorescensavlesning og Westernanalyse. Innholdet av mitokondrier i fraksjonene kan detekteres med begge metodene og det finnes mitokondrier i alle fraksjonene i både kyllingkornceller og i PC12-celler. Westernanalyse ga en jevnere fordeling i fraksjonene enn det fluorescensmålingene gjorde. I begge celletypene ble det detektert mest HSP-60 i P-250. I PC12-cellene var fordelingen av HSP-60 jevn i de fire først fraksjonene mens i kyllingkorncellene var fordelingen jevnere i fraksjonene P-500, P-750 og P-3000 enn det avlesningen av MT Green viste. Resultatene fra denne oppgaven og fra en tidligere oppgave (Austdal 2009) tyder på at det er forskjeller i de to målemetodene. For å undersøke mitokondrieinnholdet i ulike fraksjoner bør det benyttes flere metoder. Dersom man ser på innholdet av kjerner i begge celletypene så vil det meste av dette spinnes ut i P-250. Dette viste også Westernresultatene. Det vil være noe kjerner igjen i de resterende fraksjonene, men fluorescensavlesningene ga mer kjerner i de senere fraksjonene enn det Westernanalyse med Lamin A/C gjorde.

Metoden fungerer godt og skiller organeller på tetthet, men den gir ikke rene mitokondriefraksjoner. Dette er viktig informasjon å ta med videre når resultatene skal tolkes. Dersom det er ønskelig å studere én type organell må man bruke metoder som fører til enda renere fraksjoner.

4.2.2 Glutamatbehandling av rottekornceller

Kornceller fra rotte ble eksponert for glutamat og høstet etter to timer for å se om denne stresstimulusen ville endre fordelingen av organeller i fraksjonene, og om den mitokondrielle ROS-produksjonen endret seg. I rottekornceller har det tidligere blitt observert forskjeller i blant annet ROS-produksjon når cellene har blitt undersøkt i mikroskop (Mathisen, Thorkildsen et al. 2007). Allerede etter glutamateksponering i fem minutter vil mitokondrier i primærkulturer endre morfologi som følge av NMDA-reseptoraktivering. Mitokondriene vil bli kortere og de får en rundere form. Endringen i form og størrelse er reversibel og etter to timer vil mitokondriene i glutamatbehandlede celler være tilbake på kontrollverdiene. Glutamateksponeringen vil også føre til at mitokondriene slutter og bevege seg (Rintoul, Filiano et al. 2003). En endring i mitokondriefordelingen vil kunne forklares ut i fra at glutamat kan føre til en endring i mitokondrienes størrelse og form. Det kan spekuleres i om en slik endring kan føre til tetthetsforandringer hos mitokondriene og om de vil kunne fordele seg annerledes i fraksjonene. Dersom de morfologiske endringene ikke bidrar til en tetthetsendring vil man heller ikke se en endring i fraksjoneringsmønsteret. Endringene i størrelse og form kan observeres på et tidlig tidspunkt etter glutamateksponering og det bør derfor høstes celler på ulike inkubasjonstidspunkter for deretter å studere fraksjoneringsmønsteret. Mitokondriene kan ha fått tilbake sin normale morfologi på høstetidspunktet som ble brukt i denne oppgaven.

Kondensering og fragmentering av mitokondriene forekommer som følge av eksitotoksisk celledød. En redistribuering av Bax-proteinet, et pro-apoptotisk protein, ved apoptotisk celledød har blitt observert i mitokondrier fra nevronkulturer (Young, Pinon et al. 2010). I fremtiden kan det være interessant å undersøke fraksjonenes innhold av dette proteinet. Ved bruk av separasjonsmetoden kan man opparbeide fraksjoner for å studere om ROS-produksjonen er ulik i fraksjonene. I fraksjoner fra kyllingkornceller som inneholdt mitokondrier fra senere fraksjoner har det tidligere blitt observert en økning i ROS-produksjonen, men fordi cellekulturer kan ha ulik følsomhet for glutamat var det noe

variasjon i disse resultatene. Hverken denne oppgaven eller en tidligere oppgave (Austdal 2009) har funnet noen endring i fraksjoneringsmønsteret i rottekornceller etter at cellene var glutamateksponert. I denne oppgaven ble det ikke brukt glutamateksponerte kyllingkornceller fordi basaldøden var høy, og det ikke var noen glutamatindusert celledød.

Resultatene ble analysert på to ulike måter. Organellfordelingen i de ulike behandlingene ble sammenliknet og det ble ikke funnet signifikante forskjeller i glutamatbehandlede celler og ubehandlede celler. I bufferbehandlede celler var det signifikant forskjell i P-3000 mellom mitokondrieinnholdet og kjerneinnholdet. Det kan bety at kjernene har blitt fragmentert og dermed kommer ut i andre fraksjoner fordi tettheten og størrelsen har forandret seg.

Dersom mitokondrieinnholdet i behandlingene sammenliknes ble det ikke funnet noen forskjell. Det ble heller ikke funnet forskjeller i ROS-produksjonen eller kjerneinnholdet i fraksjonene i glutamatbehandlede, bufferbehandlede og ubehandlede celler. Det kan se ut til at det er en tendens til at glutamatbehandlingen fører til et høyere kjerneinnhold i P-10000 og S-10000 dersom man måler forholdet mellom Hoechst og MT Green. Det vil i så fall kunne bety at glutamatbehandlingen kan føre til kjernefragmentering. Resultatene baserer seg kun på tre paralleller og det bør gjøres flere forsøk for å se om det faktisk er en forskjell.

4.2.3 AP-endonuklease 1 og rottekornceller

Reparasjonsenzymet APE-1 finnes både i mitokondrier (mtAPE) og i kjerner (nAPE). Enzymet vil reparere DNA-skader via BER-veien. Forskjellen mellom mtAPE og nAPE er 33 aminosyrer (Chattopadhyay, Wiederhold et al. 2006). Når rottekornceller eksponeres for glutamat og deretter undersøkes for APE-1 så er det P-750, den tyngste fraksjonen, som har størst aktivitet (Austdal 2009). En oppregulering av nAPE, og ikke mtAPE, har tidligere blitt observert ved stressindusering i cellekulturer (Harrison, Hollensworth et al. 2005). Fordi P-750 var fraksjonen som inneholdt mest kjerner var det naturlig å anta at aktivitetsøkningen som ble observert skyldtes nAPE og ikke mtAPE (Austdal 2009).

Det ble i 2010 rapportert at DNA-skader i nevroner utsatt for ikke-toksiske glutamatkonsentrasjoner raskt og effektivt ble reparert ved hjelp av APE-1 (Yang, Tadokoro et al. 2010). For å undersøke om denne reparasjonen skyldes APE-1 knyttet til mitokondrier eller kjerner med en viss tetthet ble det opparbeidet fraksjoner som deretter ble analysert med Westernanalyse. APE-1 ble først detektert i et helcellelysat og i en fraksjon som inneholdt

mitokondrier, men ikke kjerner, P-3000. Deretter ble nyhøstete kornceller analysert og APE-1 ble funnet i P-750, men ikke i noen av de andre fraksjonene fra glutamatbehandlede og ubehandlede prøver. P-750 er fraksjonen som inneholder mest mitokondrier og kjerner. Det ble ikke funnet kjerner i P-3000 og P-6000. Det er ikke mulig å si om det er nAPE, mtAPE eller begge variantene som er ansvarlig for APE-1 i denne fraksjonen (P-750). I P-750 i bufferbehandlede celler (figur ikke vist i oppgaven) var det nesten ikke kjerner tilstede i P-750 og dermed også veldig lite APE-1. Det tyder derfor på at APE-1 funnet i P-750 i glutamatbehandlet og ubehandlede celler hovedsakelig var nAPE.

Det har tidligere blitt vist at nevroners reparasjon av skader på mtDNA tar forholdsvis lang tid. Etter to timer vil kun 20 % av skadene være reparert og etter 48 timer vil omtrent 80 % av mtDNA-skadene være reparert (LeDoux, Druzhyna et al. 2007). Korncellene brukt i denne oppgaven ble dyrket i 7 dager og deretter glutamateksponert og høstet etter to timer. I fremtiden kan det være aktuelt å høste glutamateksponerte rottekornceller på ulike tidspunkter for å studere en eventuell APE-1 endring.

4.2.4 Glukosedeprivering av PC12-celler

I PC12-celler ble glukosedeprivering valgt som celledødsmodell. Celledøden ved 24 timer lå på 17 %. Dette samsvarer bra med tidligere rapportert celledød på 19 % ved glukosedeprivering i PC12-celler (Liu, Song et al. 2003).

Cellene ble glukosedeprivert i 4 timer eller 24 timer og deretter høstet for å se om det var en forskjell mellom ubehandlede og behandlede celler. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller etter 4 timer eller 24 timer, men det ble observert tendenser til forskjeller i den mitokondrielle ROS-produksjonen og kjernefordelingen. Morfologien til mitokondriene i glukosedepriverte celler endret seg. Glukosedeprivering ga en forholdsvis sakte celledød, men de morfologiske endringene kunne observeres allerede etter to timer. Det kunne da se ut som om mitokondriene gikk fra en mer avlang form til en mer rund form. De hadde også begynt å danne smalere ringer rundt kjernene. Etter 24 timer var denne endringen mer utpreget. Denne endringen i mitokondrienes morfologi har tidligere blitt observert i astrocytter (Ouyang and Giffard 2003).

Etter 4 timer var kjernenes fraksjoneringsmønster, målt med Hoechst, nesten likt mellom behandlede og ubehandlede celler og godt over 80 % kom ut i den tyngste fraksjonen. Det var

ingen endring i distribueringen av kjerner mellom ubehandlede og glukosedepriverte celler. Det samme gjaldt ER. I P-250 kunne det observeres en tendens til at det var noe mindre ER i behandlede celler enn i ubehandlede mens det i S-10000 var motsatt. Innad i hver fraksjon var det ingen forskjell på mitokondriefordelingen og ROS-produksjonen målt med MT Green og MT Red. MT Green og MT Red ble relatert til hverandre for å se om det da kunne observeres forskjeller som ellers er vanskelige å se. Forholdstallene MT Red/MT Green ga en pekepinn på om ROS-produksjonen økte i forhold til mengde mitokondrier i fraksjonen. Det kan tyde på at P-750 var fraksjonen hvor endringen var størst, men det ble ikke funnet signifikante forskjeller. Det kunne se ut til at glukosedepriivering førte til en økning i ROS-produksjonen hos denne subpopulasjonen av mitokondrier, men dette var kun en tendens. I P-10000 og S-10000 var det ubehandlede celler som hadde en økning i ROS-produksjonen, men her var det lite mitokondrier igjen og resultatene varierte kraftig.

Etter 24 timer var det ingen forskjeller i fraksjoneringsmønsteret mellom behandlede og ubehandlede celler. Det var en tendens til en økning i kjerneinnholdet i fraksjoner fra glukosedepriverte celler sammenliknet med ubehandlede celler. Det kan bety at kjernene har blitt fragmentert slik at de kommer i ulike fraksjoner. Fragmentering av DNA og kjerner forekommer når cellene dør (Raff 1992). Det var ingen signifikante endringer i ER-innholdet og det meste av ER kom ut i P-250. Det var en tendens til at den mitokondrielle ROS-produksjonen var litt høyere i de glukosedepriverte celler sammenliknet med ubehandlede celler i fraksjon P-500. Mitokondriene i P-250 laget mest ROS med en påfølgende reduksjon i de resterende fraksjonene. Mitokondriene i fraksjonene P-10000 og S-10000 laget minst ROS. Forholdet mellom den totale mengden MT Red og MT Green ble deretter beregnet. Den totale ROS-produksjonen endret seg ikke over tid sammenliknet med ubehandlede celler. Det kan være med på å forklare at det heller ikke ble funnet endringer i den mitokondrielle ROS-produksjonen i fraksjonene.

Videre kan man benytte NGF-differensierte PC12-celler som har dannet utløpere. Da kan distribusjonen av ROS-produserende mitokondrier i ulike deler av cellene studeres i mikroskopet og ved hjelp av separasjonsmetoder. Morfologiske endringer kan observeres tidlig i forløpet i glukosedepriverte uddifferensierte PC12-celler, men det er uvisst om den samme morfologien kan observeres i differensierte celler. Det er i nevronutløpere det tidligere har blitt sett en forskjell i mitokondriell ROS-produksjon som følge av glutamatbehandling (Mathisen, Thorkildsen et al. 2007). Det vil være interessant å undersøke om kan man

observere en liknende lokalisering av ROS-produserende mitokondrier ved glukosedepriivering i NGF-differensierte PC12-celler.

5 Konklusjon

- Mitokondrier, kjerner og ER fordeles i fraksjoner fra ubehandlede rottekornceller, kyllingkornceller og PC12-celler opparbeidet med differensiell sentrifugering. Det er mest mitokondrier, kjerner og ER i den første fraksjonen. Resultatene varierer avhengig av målemetoden og det bør derfor brukes flere metoder for å bestemme organelleinnholdet i ulike fraksjoner. Både fluorescensavlesning og Westernanalyse kan benyttes.
- APE-1 kan detekteres med Westernanalyse i fraksjoner som inneholder kjerner og mitokondrier. Det ser ut til at enzymaktiviteten oppreguleres som følge av glutamatbehandling og at det hovedsakelig er nAPE tilstede i fraksjonene. Rottekornceller som har blitt glutamateksponert endrer ikke fordelingen av mitokondriell ROS-produksjon eller organeller i fraksjonene. Det er en tendens til at glutamatbehandling fører til kjernefragmentering.
- Glukosedepriivering førte til celledød målt med to ulike metoder, trypanblåfarging og MTT-assay. Den mitokondrielle ROS-produksjonen i cellene endres ikke etter 4 timer eller 24 timer uten glukose.
- Glukosedepriivering fører til morfologiske endringer i cellene. Mitokondriene går fra en avlang form til en rundere form slik at cellene ser mer kornete ut og endringen kan observeres raskt. Etter 24 timer er det en tendens til at glukosedepriivering fører til at kjernene fragmenteres.

Forkortelser

AIF	Apoptosis inducing factor/ Apoptoseinduserende faktor
AMPA	Alfa-amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoksazolpropionat
AP	Apurin/apyrimidin
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1/Apoptotisk protease-aktiverende factor 1
APE-1	AP-endonuklease 1
ATP	Adenosintrifosfat
Bax	Bcl-2-assosiert X-protein
Bcl-2	B-cellelymfom 2
BER	Base excision repair
Bid	BH3 interacting domain death agonist
DIV	Dag <i>in vitro</i>
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dRP	Deoksyribosefosfat
ER	Endoplasmatisk retikulum
FEN-1	Flap endonuclease 1
HNE	Hydroksynonenal
HSP-60	Heat shock protein 60
IP ₃	Inositol trifosfat
LP-BER	Long patch base excision repair
MAO	Monoamin oksidase
MQ	Milli Q
MT Green	MitoTracker® Green FM
MT Red	MitoTracker® CM-H ₂ XROS
mtAPE	Mitokondriell APE
mtDNA	Mitokondrielt DNA
NAO	10N-nonyl acridine orange
nAPE	Nukleær APE
nDNA	Nukleært DNA
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N-metyl-D-aspartat

P-10000	Pellet 10000g
P-250	Pellet 250g
P-3000	Pellet 3000g
P-500	Pellet 500g
P-6000	Pellet 6000g
P-750	Pellet 750g
PAC-1	Procaspace-activating factor 1
Ref-1	Redox factor 1
rER	Rough endoplasmic reticulum/Granulert endoplasmatisk retikulum
ROS	Reaktive oksygenforbindelser
RPM	Rounds per minute/ Omdreiningen per minutt
S-10000	Supernatant 10000g
SEM	Standardfeil
sER	Smooth endoplasmic reticulum/Glatt endoplasmatisk retikulum
SP-BER	Short patch base excision repair
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

Referanser

- Agnello, M., G. Morici, et al. (2008). "A method for measuring mitochondrial mass and activity." Cytotechnology **56**(3): 145-149.
- Ankarcrona, M., J. M. Dypbukt, et al. (1995). "Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function." Neuron **15**(4): 961-973.
- Arai, R., N. Karasawa, et al. (2002). "Differential subcellular location of mitochondria in rat serotonergic neurons depends on the presence and the absence of monoamine oxidase type B." Neuroscience **114**(4): 825-835.
- Aras, M. A., K. A. Hartnett, et al. (2008). "Assessment of cell viability in primary neuronal cultures." Curr Protoc Neurosci **Chapter 7**: Unit 7 18.
- Arndt-Jovin, D. J. and T. M. Jovin (1977). "Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content." J Histochem Cytochem **25**(7): 585-589.
- Austdal, L. P. E. (2009). Mitokondriell heterogenitet i nevronkulturer. Farmasøytisk Institutt. Oslo, Universitet i Oslo. **Mastergrad**.
- Bergeron, J. J., M. B. Brenner, et al. (1994). "Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum." Trends Biochem Sci **19**(3): 124-128.
- Bhakat, K. K., A. K. Mantha, et al. (2009). "Transcriptional regulatory functions of mammalian AP-endonuclease (APE1/Ref-1), an essential multifunctional protein." Antioxid Redox Signal **11**(3): 621-638.
- Bjorntorp, P., S. Bjorkerud, et al. (1965). "Subcellular fractionation of human liver." Biochim Biophys Acta **111**(2): 375-383.
- Bogenhagen, D. F., K. G. Pinz, et al. (2001). "Enzymology of mitochondrial base excision repair." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **68**: 257-271.
- Bonfoco, E., D. Krainc, et al. (1995). "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7162-7166.
- Borgese, N., M. Francolini, et al. (2006). "Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 358-364.
- Brustovetsky, T., V. Li, et al. (2009). "Stimulation of glutamate receptors in cultured hippocampal neurons causes Ca²⁺-dependent mitochondrial contraction." Cell Calcium **46**(1): 18-29.
- Buckman, J. F., H. Hernandez, et al. (2001). "MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants." J Neurosci Methods **104**(2): 165-176.

- Burgoyne, R. D. and M. A. Cambray-Deakin (1988). "The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell." Brain Res **472**(1): 77-101.
- Castle, J. D. (1998). "Overview of cell fractionation." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 1.
- Chang, D. T., A. S. Honick, et al. (2006). "Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons." J Neurosci **26**(26): 7035-7045.
- Chattopadhyay, R., L. Wiederhold, et al. (2006). "Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells." Nucleic Acids Res **34**(7): 2067-2076.
- Chen, H. and D. C. Chan (2009). "Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases." Hum Mol Genet **18**(R2): R169-176.
- Cheng, M. Y., F. U. Hartl, et al. (1990). "The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly." Nature **348**(6300): 455-458.
- Choi, D. W. (1985). "Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent." Neurosci Lett **58**(3): 293-297.
- Clark, J. B. and W. J. Nicklas (1970). "The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization." J Biol Chem **245**(18): 4724-4731.
- Cohen, B. H. (2010). "Pharmacologic effects on mitochondrial function." Dev Disabil Res Rev **16**(2): 189-199.
- Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." Cerebellum **1**(1): 41-55.
- D'Herde, K., B. De Prest, et al. (2000). "Ultrastructural localization of cytochrome c in apoptosis demonstrates mitochondrial heterogeneity." Cell Death Differ **7**(4): 331-337.
- Daley, J. M., C. Zakaria, et al. (2010). "The endonuclease IV family of apurinic/apyrimidinic endonucleases." Mutat Res **705**(3): 217-227.
- Daugas, E., S. A. Susin, et al. (2000). "Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis." FASEB J **14**(5): 729-739.
- De Duve, C. and H. Beaufay (1981). "A short history of tissue fractionation." J Cell Biol **91**(3 Pt 2): 293-299.
- Demple, B. and J. S. Sung (2005). "Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair." DNA Repair (Amst) **4**(12): 1442-1449.
- Englander, E. W. (2008). "Brain capacity for repair of oxidatively damaged DNA and preservation of neuronal function." Mech Ageing Dev **129**(7-8): 475-482.

- Farooq, M. and W. T. Norton (1978). "A modified procedure for isolation of astrocyte- and neuron-enriched fractions from rat brain." J Neurochem **31**(4): 887-894.
- Fishel, M. L., M. R. Vasko, et al. (2007). "DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair?" Mutat Res **614**(1-2): 24-36.
- Fleury, C., B. Mignotte, et al. (2002). "Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling." Biochimie **84**(2-3): 131-141.
- Gallo, V., M. T. Ciotti, et al. (1982). "Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(24): 7919-7923.
- Gallo, V., A. Kingsbury, et al. (1987). "The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture." J Neurosci **7**(7): 2203-2213.
- Garcia Fernandez, M. I., D. Ceccarelli, et al. (2004). "Use of the fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange in quantitative and location assays of cardiolipin: a study on different experimental models." Anal Biochem **328**(2): 174-180.
- Graham, J. M. (2001a). "Purification of a crude mitochondrial fraction by density-gradient centrifugation." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 4.
- Graham, J. M. (2001b). "Isolation of mitochondria from tissues and cells by differential centrifugation." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 3.
- Graham, J. M. (2001c). "Isolation of peroxisomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 5.
- Green, A. R. and A. Shuaib (2006). "Therapeutic strategies for the treatment of stroke." Drug Discov Today **11**(15-16): 681-693.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(7): 2424-2428.
- Greenwood, S. M. and C. N. Connolly (2007). "Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity." Neuropharmacology **53**(8): 891-898.
- Gruenbaum, Y., K. L. Wilson, et al. (2000). "Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions." J Struct Biol **129**(2-3): 313-323.
- Hacki, J., L. Egger, et al. (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**(19): 2286-2295.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." Am J Med **91**(3C): 14S-22S.
- Hamberger, A., C. Blomstrand, et al. (1970). "Comparative studies on mitochondria isolated from neuron-enriched and glia-enriched fractions of rabbit and beef brain." J Cell Biol **45**(2): 221-234.

- Harrison, J. F., S. B. Hollensworth, et al. (2005). "Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance." Nucleic Acids Res **33**(14): 4660-4671.
- Hertel, C., N. Hauser, et al. (1996). "Beta-amyloid-induced cell toxicity: enhancement of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-dependent cell death." J Neurochem **67**(1): 272-276.
- Hussain, S. G. and K. V. Ramaiah (2007). "Endoplasmic reticulum: stress, signalling and apoptosis." Current Science **93**(12): 1684-1696.
- Isaev, N. K., E. V. Stelmashook, et al. (2008). "Mitochondrial free radical production induced by glucose deprivation in cerebellar granule neurons." Biochemistry (Mosc) **73**(2): 149-155.
- Itoh, H., A. Komatsuda, et al. (2002). "Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration." Eur J Biochem **269**(23): 5931-5938.
- Jacobs, C. M., P. Aden, et al. (2006). "Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture." J Neurosci Methods **156**(1-2): 129-135.
- Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-554.
- Karbowski, M. and R. J. Youle (2003). "Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis." Cell Death Differ **10**(8): 870-880.
- Kaufman, R. J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls." Genes Dev **13**(10): 1211-1233.
- Kim, J., P. E. Minkler, et al. (2011). "Cardiolipin: characterization of distinct oxidized molecular species." J Lipid Res **52**(1): 125-135.
- Kristian, T. (2010). "Isolation of mitochondria from the CNS." Curr Protoc Neurosci **Chapter 7**: Unit 7 22.
- Krysko, D. V., F. Roels, et al. (2001). "Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis." J Histochem Cytochem **49**(10): 1277-1284.
- Kuff, E. L. and W. C. Schneider (1954). "Intracellular distribution of enzymes. XII. Biochemical heterogeneity of mitochondria." J Biol Chem **206**(2): 677-685.
- LeDoux, S. P., N. M. Druzhyna, et al. (2007). "Mitochondrial DNA repair: a critical player in the response of cells of the CNS to genotoxic insults." Neuroscience **145**(4): 1249-1259.
- Li, Y., M. Chopp, et al. (1995). "Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats." Stroke **26**(7): 1252-1257; discussion 1257-1258.

- Lipton, S. A. and P. A. Rosenberg (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." N Engl J Med **330**(9): 613-622.
- Liu, P. and B. Dimple (2010). "DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought?" Environ Mol Mutagen **51**(5): 417-426.
- Liu, Y., X. D. Song, et al. (2003). "Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line." J Cell Mol Med **7**(1): 49-56.
- Mark, L. P., R. W. Prost, et al. (2001). "Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging." AJNR Am J Neuroradiol **22**(10): 1813-1824.
- Mark, R. J., Z. Pang, et al. (1997). "Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation." J Neurosci **17**(3): 1046-1054.
- Mathisen, G. H., I. H. Thorkildsen, et al. (2007). "Secretory PLA2-IIA and ROS generation in peripheral mitochondria are critical for neuronal death." Brain Res **1153**: 43-51.
- Mattson, M. P. (2006). "Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders." Antioxid Redox Signal **8**(11-12): 1997-2006.
- McEntee, W. J. and T. H. Crook (1993). "Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain." Psychopharmacology (Berl) **111**(4): 391-401.
- Meldrum, B. S. (2000). "Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology." J Nutr **130**(4S Suppl): 1007S-1015S.
- Moe, L. K. (2010). Procaspase-Activating Compound 1 (PAC-1) - Effekter på celledød og caspaseaktivitet i cellelinjen PC12 og kyllingkornceller. Farmasøytisk Institutt. Oslo, Universitet i Oslo. **Mastergrad**.
- Moley, K. H. and M. M. Mueckler (2000). "Glucose transport and apoptosis." Apoptosis **5**(2): 99-105.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Okouchi, M., O. Ekshyyan, et al. (2007). "Neuronal apoptosis in neurodegeneration." Antioxid Redox Signal **9**(8): 1059-1096.
- Olney, J. W. and L. G. Sharpe (1969). "Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate." Science **166**(903): 386-388.
- Ouyang, Y. B. and R. G. Giffard (2003). "Bcl-XL maintains mitochondrial function in murine astrocytes deprived of glucose." J Cereb Blood Flow Metab **23**(3): 275-279.

- Parihar, M. S. and G. J. Brewer (2007). "Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons." J Neurosci Res **85**(5): 1018-1032.
- Paschen, W. and J. Doutheil (1999). "Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: a key mechanism underlying neuronal cell injury?" J Cereb Blood Flow Metab **19**(1): 1-18.
- Pivovarova, N. B. and S. B. Andrews (2010). "Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons." FEBS J **277**(18): 3622-3636.
- Popp, R. L., J. C. Reneau, et al. (2008). "Cerebellar granule cells cultured from adolescent rats express functional NMDA receptors: an in vitro model for studying the developing cerebellum." J Neurochem **106**(2): 900-911.
- Porter, K. R., A. Claude, et al. (1945). "A Study of Tissue Culture Cells by Electron Microscopy : Methods and Preliminary Observations." J Exp Med **81**(3): 233-246.
- Presley, A. D., K. M. Fuller, et al. (2003). "MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **793**(1): 141-150.
- Prinetti, A., V. Chigorno, et al. (2000). "Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study." J Biol Chem **275**(16): 11658-11665.
- Privat, A., A. M. Marson, et al. (1979). "In vitro models of neural growth and differentiation." Prog Brain Res **51**: 335-356.
- Pysh, J. J. and T. Khan (1972). "Variations in mitochondrial structure and content of neurons and neuroglia in rat brain: an electron microscopic study." Brain Res **36**(1): 1-18.
- Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death." Nature **356**(6368): 397-400.
- Ramnani, N. (2006). "The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function." Nat Rev Neurosci **7**(7): 511-522.
- Reers, M., S. T. Smiley, et al. (1995). "Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye." Methods Enzymol **260**: 406-417.
- Reyland, M. E. and A. P. Bradford (2010). Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy, University of Colorado Denver.
- Reynolds, I. J. and T. G. Hastings (1995). "Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation." J Neurosci **15**(5 Pt 1): 3318-3327.

- Rintoul, G. L., A. J. Filiano, et al. (2003). "Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons." J Neurosci **23**(21): 7881-7888.
- Sandhu, N., K. Duus, et al. (2007). "Peptide binding specificity of the chaperone calreticulin." Biochim Biophys Acta **1774**(6): 701-713.
- Sastry, P. S. and K. S. Rao (2000). "Apoptosis and the nervous system." J Neurochem **74**(1): 1-20.
- Seeberg, E., L. Eide, et al. (1995). "The base excision repair pathway." Trends Biochem Sci **20**(10): 391-397.
- Seil, F. J. and R. M. Herndon (1970). "Cerebellar granule cells in vitro. A light and electron microscope study." J Cell Biol **45**(2): 212-220.
- Shanker, G., J. L. Aschner, et al. (2004). "Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury." Brain Res Mol Brain Res **128**(1): 48-57.
- Sims, N. R. (1990). "Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation." J Neurochem **55**(2): 698-707.
- Singh, G., M. A. Siddiqui, et al. (2009). "Oxygen glucose deprivation model of cerebral stroke in PC-12 cells: glucose as a limiting factor." Toxicol Mech Methods **19**(2): 154-160.
- Stout, A. K., H. M. Raphael, et al. (1998). "Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake." Nat Neurosci **1**(5): 366-373.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-885.
- Tell, G., F. Quadrifoglio, et al. (2009). "The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme." Antioxid Redox Signal **11**(3): 601-620.
- Valenzuela, C. F., B. Lindquist, et al. (2010). "A review of synaptic plasticity at Purkinje neurons with a focus on ethanol-induced cerebellar dysfunction." Int Rev Neurobiol **91**: 339-372.
- Ward, M. W., D. Kogel, et al. (2004). "Neuronal apoptosis: BH3-only proteins the real killers?" J Bioenerg Biomembr **36**(4): 295-298.
- Weisblum, B. and E. Haenssler (1974). "Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA." Chromosoma **46**(3): 255-260.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial fusion and fission in cell life and death." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 872-884.

- WHO. (2006). "STEPwise approach to stroke surveillance." Retrieved 29/03, 2011, from <http://www.who.int/chp/steps/stroke/en/index.html>.
- Wilkin, G. P., G. L. Reijnierse, et al. (1979). "Subcellular fractionation of rat cerebellum: separation of synaptosomal populations and heterogeneity of mitochondria." Brain Res **164**: 153-163.
- Willis, S., C. L. Day, et al. (2003). "The Bcl-2-regulated apoptotic pathway." J Cell Sci **116**(Pt 20): 4053-4056.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.
- Yang, J. L., T. Tadokoro, et al. (2010). "Neurons efficiently repair glutamate-induced oxidative DNA damage by a process involving CREB-mediated up-regulation of apurinic endonuclease 1." J Biol Chem **285**(36): 28191-28199.
- Yang, J. L., L. Weissman, et al. (2008). "Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1110-1120.
- Young, K. W., L. G. Pinon, et al. (2010). "Different pathways lead to mitochondrial fragmentation during apoptotic and excitotoxic cell death in primary neurons." J Biochem Mol Toxicol **24**(5): 335-341.
- Yousif, L. F., K. M. Stewart, et al. (2009). "Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications." Chembiochem **10**(12): 1939-1950.